EINFLUSS VON LEUCIN UND ARGININ AUF DIE SEKRETION VON INSULIN SOWIE DEN NADPH/NADP–QUOTIENTEN UND DEN NADH/NAD–QUOTIENTEN LANGERHANSSCHER INSELN

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Erika Hoppe
aus Buxtehude

1978

EINFLUSS VON LEUCIN UND ARGININ AUF DIE SEKRETION VON INSULIN SOWIE DEN NADPH/NADP–QUOTIENTEN UND DEN NADH/NAD–QUOTIENTEN LANGERHANSSCHER INSELN

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Erika Hoppe
aus Buxtehude

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juni 1978

Dekan: Prof. Dr. H. Auterhoff

1. Berichterstatter : Prof. Dr. H.P.T. Ammon

2. Berichterstatter : Prof. Dr. E. Reinhard

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde im April 1975 unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H.P.T. Ammon am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen begonnen und im April 1978 abgeschlossen.

Herrn Professor Dr. H.P.T. Ammon
danke ich für die zahlreichen Anregungen und die freundliche Unterstützung bei dieser Arbeit.

Ferner danke ich allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Ammon für stete Diskussionsbereitschaft und gute Zusammenarbeit.

Abkürzungen

ADH	Alkohol-Dehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
c-AMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
6-AN	6-Aminonicotinsäureamid
ATP	Adenosintriphosphat
t-BHP	tert. Butylhydroperoxid
p-CMB	para-Chlormercuribenzoat
E	Einheiten
Δ E	Extinktionsänderung
EDTA	Äthylendiamin-tetraessigsäure
G-6-P	Glucose-6-phosphat
G-6-P-DH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
Gl-DH	Glutamat-Dehydrogenase
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
IRI	immunoreactives Insulin
KIC	α-Ketoisocapronsäure
KRB-Lösung	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MB	Methylenblau
μE	Mikroeinheiten
μM	mikromolar
μmol	Mikromol
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduziert

n. s.	nicht signifikant
P	Probability
pM	pikomolar
pmol	Pikomol
PPS	Pentosephosphatshunt
SEM	Standard Error of the Mean
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1	Stand der Forschung	1
1.2	Fragestellung	5
2.	Material und Methodik	7
2.1	Versuchstiere	7
2.2	Geräte	7
2.3	Chemikalien und Enzyme	7
2.4	Nähr- und Reagenzlösungen	8
2.4.1	Hanks' Lösung	8
2.4.2	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung	8
2.4.3	Cycling-Reagenz zur NADH- und NAD-Bestimmung	10
2.4.4	Cycling-Reagenz zur NADPH- und NADP-Best.	10
2.4.5	Phosphogluconat-Reagenz	11
2.4.6	Pyruvat-Reagenz	11
2.4.7	Reaktionsgemisch zur G-6-P-Bestimmung	11
2.4.8	Reaktionsgemisch zur 6-PG-Bestimmung	12
2.4.9	Cycling-Reagenz zur G-6-P- und 6-PG-Best.	12
2.5	Standardlösungen und deren Gehaltsbestimmung	13
2.5.1	NADPH-Standard	13
2.5.2	NADP-Standard	14
2.5.3	NADH-Standard	16
2.5.4	NAD-Standard	17
2.5.5	Glucose-6-phosphat-Standard	18
2.5.6	6-Phosphogluconat-Standard	20
2.6	Isolierung der Langerhansschen Inseln	22

		Seite
2.7	Vorinkubation	23
2.8	Hauptinkubation	24
2.9	Meßmethoden	24
2.9.1	Insulinbestimmung	24
2.9.2	Bestimmung der Pyridinnucleotide	26
2.9.2.1	NADH, NAD	27
2.9.2.2	NADPH, NADP	29
2.9.3	Bestimmung von Glucose-6-phosphat	31
2.9.4	Bestimmung von 6-Phosphogluconat	33
2.10	Versuchsauswertung	34
2.11	Darstellung der Ergebnisse	34
3.	Versuchsergebnisse	35
3.1	Leucin	35
3.1.1	Einfluß von Leucin auf NADPH, NADP und Insulinsekretion	35
3.1.2	Einfluß von Leucin auf NADH und NAD	42
3.1.3	Einfluß der Inkubationsdauer auf NADPH, NADH und Insulinsekretion	45
3.1.4	Einfluß verschiedener Leucin- und Glucose-konzentrationen auf NADPH u. Insulinsekretion	49
3.1.5	Einfluß von Leucin und Glucose auf 6-PG und G-6-P	54
3.2	Arginin	58
3.2.1	Einfluß von Arginin auf NADPH, NADP und Insulinsekretion	58

		Seite
3.2.2	Einfluß von Arginin auf NADH und NAD	63
3.2.3	Einfluß der Inkubationsdauer auf NADPH, NADH und Insulinsekretion	66
3.2.4	Einfluß verschiedener Arginin- und Glucosekonzentrationen auf NADPH u. Insulinsekr.	70
3.2.5	Einfluß von Arginin auf G-6-P und 6-PG	75
3.3	Vergleich der Wirkungen von Leucin u. Arginin	77
4.	Diskussion	81
4.1	Leucin	81
4.2	Arginin	95
5.	Zusammenfassung	99
6.	Anhang, Ergebnisse tabellarisch	103
7.	Literaturverzeichnis	113

1. Einleitung

1.1 Stand der Forschung

Daß einige Aminosäuren, vor allem Leucin und Arginin, sowohl in vivo als auch in vitro zur Freisetzung von Insulin aus den ß-Zellen der Langerhansschen Inseln führen, konnte von mehreren Autoren gezeigt werden (1-7), über den Mechanismus der durch Aminosäuren induzierten Insulinsekretion besteht jedoch noch Unklarheit. Ebenso ist noch weitgehend ungeklärt, auf welchem Wege die Glucose, der wichtigste physiologische Stimulator, zur Sekretion von Insulin führt, ob und in welchem Umfang die gleichzeitige Anwesenheit von Glucose das Ausmaß der durch Aminosäuren induzierten Insulinsekretion beeinflußt.

Leucin und Arginin setzen Insulin sowohl in Abwesenheit von Glucose frei (5,8), sie verstärken aber auch die durch Glucose induzierte Insulinsekretion (3,5,7,8).
So wurde bei Perfusion des isolierten Rattenpankreas mit Leucin oder Arginin (jeweils 16 mM) in Gegenwart von Glucose in einer Konzentration von 3 mg/ml eine höhere Insulinsekretion ausgelöst als jeweils mit Leucin, Arginin oder Glucose allein (5).
Von anderen Autoren wurde jedoch auch auf sich gegenseitig hemmende Einflüsse von Glucose und Aminosäuren hingewiesen: So ist Leucin (10 mM) nach Befunden von Malaisse und Malaisse-Lagae (3) inbezug auf seine insulinfreisetzende Wirkung in Gegenwart von substimulatorischen Glucosekonzentrationen effektiver als in Kombination mit höheren Glucosemengen. An perifundierten Inseln verursachte Leucin in Abwesenheit von Gluco-

se eine stärkere Insulinfreisetzung als bei gleichzeitiger Anwesenheit von Glucose (5 mM)(9).
Arginin ist bezüglich der Insulinfreisetzung aus dem isoliert perfundierten Pankreas zusammen mit Glucosekonzentrationen zwischen 0,5 und 1,5 mg/ml deutlicher wirksam als in Kombination mit einer Glucosedosis über 3 mg/ml (8), außerdem bewirkt eine 15 minütige Vorbehandlung des Pankreas mit Arginin eine Abschwächung der Wirkung von darauf folgenden hohen Glucosegaben (8).

Geht man davon aus, daß sich Arginin und Leucin hinsichtlich ihrer stimulierenden Wirkung auf die Insulinsekretion mit Glucose synergistisch verhalten, dann erhebt sich die Frage, auf welche Weise Glucose die durch Leucin und Arginin induzierte Insulinsekretion beeinflussen kann. In diesem Zusammenhang wäre es denkbar, daß dem Stoffwechsel der Glucose bzw. der Aminosäuren in der ß-Zelle eine Bedeutung zukommt (10-18). Es bestehen folgende Möglichkeiten:

1. Der Stoffwechsel der Glucose liefert Produkte, die für die insulinfreisetzende Wirkung der Aminosäuren als Voraussetzung oder zur Verstärkung nötig sind.
2. Die Aminosäuren stellen Produkte ihres eigenen Stoffwechsels oder aus dem Stoffwechsel der Glucose zur Verfügung, die dann den sekretorischen Effekt der Glucose erhöhen.
3. Die Aminosäuren stellen Produkte ihres eigenen Stoffwechsels oder des Stoffwechsels der Glucose bereit, die den insulinfreisetzenden Effekt der Aminosäuren selbst erhöhen.

Die Bedeutung des Glucosestoffwechsels für den Mechanismus der Insulinfreisetzung ergibt sich aus folgenden Beobachtungen:
Die Glucose wird in der ß-Zelle auf 2 verschiedenen Wegen verstoffwechselt, zum einen über den Embden-Meyerhof-Abbau und zum anderen über den Pentosephosphatshunt (10, 16, 19, 20). Da die Aktivität des glykolytischen Abbaus mit der durch Glucose induzierten Insulinfreisetzung korreliert (10), die Insulinsekretion jedoch ausbleibt, sobald die Glykolyse gehemmt wird, z. B. mit 2-Desoxyglucose (21-23), ist offensichtlich, daß der Metabolismus der Glucose über den Glykolyseweg für die insulinfreisetzende Wirkung der Glucose selbst nötig ist. Jodacetat, eine Substanz, die u. a. die Glycerinaldehyd-Dehydrogenase, also die Bildung von 1,3-Diphosphoglycerat, hemmt (24), bewirkt ebenfalls eine Hemmung der durch Glucose induzierten Insulinsekretion. Die Hemmung tritt auch dann ein, wenn die durch Jodacetat gestörte Energieversorgung der ß-Zelle durch Zusatz von Pyruvat, welches für ausreichende ATP-Produktion sorgt, ohne selbst die Insulinsekretion zu beeinflussen, wiederhergestellt ist (25-27).

Auf eine mögliche Bedeutung des Glucosemetabolismus über den Pentosephosphatshunt für den Insulinsekretionsvorgang wiesen Ammon und Mitarbeiter kürzlich erneut hin: Die Aktivität des PPS, gemessen durch die Bestimmung des ^{14}C-1-Glucose-/^{14}C-6-Glucose-Oxidation-Quotienten, ist abhängig von der Glucosekonzentration und korreliert mit der durch Glucose induzierten Insulinfreisetzung (28). Inseln foetaler Ratten vermögen die Glucose über die Glykolyse, nicht aber über den PPS abzubauen, sie sind eben-

falls nicht in der Lage, auf einen Glucosereiz mit einer Insulinsekretion zu antworten. Erst dann, wenn bei neugeborenen Ratten die Glucoseoxidation über den PPS ansteigt, setzt auch eine durch Glucose induzierbare Insulinsekretion ein (29).

Die Hemmung der glucoseinduzierten Insulinsekretion durch exogenes Insulin geht mit einer Hemmung der Aktivität des PPS einher (30).

Eine verminderte Aktivität des PPS, z. B. ausgelöst durch 6-AN, einem Antimetaboliten der Pyridinnucleotidsynthese (vorwiegend NADPH), ist stets begleitet von einer Hemmung der durch Glucose induzierten Insulinfreisetzung (31,32).

Es ist nicht geklärt, auf welche Weise der PPS zur Stimulierung der Insulinsekretion durch Glucose beiträgt. Eine bedeutende Rolle scheint das NADPH dabei zu spielen: Durch Glucose wird dosisabhängig eine Erhöhung des NADPH/NADP-Quotienten erzielt. Die Höhe des NADPH/NADP-Quotienten steht in deutlicher Korrelation zur freigesetzten Insulinmenge (33).

Unter den Bedingungen des Hungers ist die Zunahme des NADPH/NADP-Quotienten bei Glucosestimulation geringer als bei normal gefütterten Tieren, gleichzeitig ist auch die durch Glucose induzierbare Insulinsekretion im Hunger weniger stark als bei normalem Ernährungszustand (34).

Bei Zusatz von Methylenblau, einem Oxidationsmittel für NADPH (nicht für NADH), zu isolierten Pankreasinseln der Ratte erfolgt, abhängig von der Methylenblaukonzentration, eine Abnahme des NADPH/NADP-Quotienten, gleichzeitig ist eine Verminderung der durch Glucose stimulierbaren Insulinsekretion zu beobachten (35).

Eine Erniedrigung des NADPH/NADP-Quotienten tritt eben-

falls bei Feedback-Hemmung der glucoseinduzierten Insulinsekretion durch exogenes Insulin auf (30).
Diese Befunde sprechen dafür, daß das NADPH möglicherweise eine Funktion beim Sekretionsvorgang des Insulins aus der ß-Zelle der Langerhansschen Insel ausübt.

1.2 Fragestellung

Panten et al. (9) zeigten, daß sowohl die durch Glucose als auch die durch Leucin induzierte Insulinsekretion mit einem Anstieg der Fluoreszens der gesamten reduzierten Pyridinnucleotide, der Summe aus NADH und NADPH, einhergeht. Aus den Ergebnissen ging jedoch nicht hervor, ob es sich um einen Anstieg der Konzentration des NADHs, das der Glykolyse und dem Citratzyklus entstammt, oder des NADPHs, einem Produkt des PPS, oder beider Substanzen handelte.

Da es denkbar ist, daß insbesondere bei erhöhten NADPH-Konzentrationen es ursächlich zu einer verstärkten Insulinsekretion kommen kann, war von großem Interesse, ob an der beobachteten Fluoreszenszunahme auch ein NADPH-Anstieg beteiligt war.
Die Aufgabe dieser Arbeit bestand darin, nach einer Methode (36), die es gestattet, NADH, NAD, NADPH und NADP jeweils getrennt zu bestimmen, zunächst den Einfluß von Leucin und Arginin auf den Redoxzustand zum einen des NADH/NAD-Systems und zum anderen des NADPH/NADP-Systems zu untersuchen und festzustellen, ob eine möglicherweise stattfindende Zunahme des NADPH/NADP-Quotienten unter ähnlichen Bedingungen erfolgt, wie die durch Leucin bzw.

Arginin stimulierbare Insulinsekretion.

Es sollte ferner geprüft werden, ob Leucin und Arginin auch dann in der Lage sind, Insulin freizusetzen, wenn durch Oxidation von NADPH der Quotient experimentell herabgesetzt wird.

Weitere Untersuchungen, bei denen der Einfluß sowohl von Leucin und Arginin als auch von Glucose in jeweils verschiedenen Konzentrationen auf die Insulinsekretion und den NADPH-Gehalt gemessen wurde, sollten zur Klärung von Widersprüchlichkeiten beitragen, die in der Literatur hinsichtlich verschiedener Aussagen über Interaktionen zwischen den Aminosäuren und der Glucose beim Mechanismus der Insulinsekretion bestehen.

Da, wie in der Arbeit gezeigt werden wird, Leucin bzw. Arginin unter bestimmten Bedingungen den NADPH/NADP-Quotienten erhöhten, sollte anschließend untersucht werden, ob dieser Erhöhung evtl. eine Beschleunigung der enzymatischen Dehydrierung des Glucose-6-phosphats zu 6-Phosphogluconat zugrunde liegt.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts von 200-300 g Körpergewicht verwendet. Die Tiere erhielten Standardtrockenfutter der Firma Altromin, Lage/Lippe, und Trinkwasser ad libitum, sie wurden in temperatur- und lichtkontrollierten Räumen gehalten.

2.2 Geräte

Christ-Kühlzentrifuge UJ II KS
Schüttelwasserbad, Firma Köttermann
Stereomikroskop Nikon SM6
Gamma-Zähler, Nuclear Chicago
Fluoripoint-Spectralfluorimeter, Bairo-Atomic
Spectralphotometer PM6, Zeiss
Tischkomputer, Olivetti
Whirlmix, Ritsch
Rührstab 3351

2.3 Chemikalien und Enzyme

Alkohol-Dehydrogenase	Boehringer Mannheim
Adenosindiphosphat	" "
Collagenase (196 E/mg)	Worthington Biochem.
α-D-Glucose	Serva Heidelberg
Glucose-6-phosphat	Boehringer Mannheim
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	" "
Glutamat-Dehydrogenase	" "
INSIK-1 (R)	Isotopendienst West
(Insulin Radioimmunoassay Kit)	Sprendlingen

α-Ketoglutarsäure	Boehringer Mannheim
Lactat-Dehydrogenase	" "
Methylenblau	Fluka Buchs
NAD, NADH, NADP und NADPH	Boehringer Mannheim
6-Phosphogluconat	" "
6-Phosphogluconat-Dehydrogenase	" "
Ratteninsulin	Novo Lab. Copenhagen
Rinderserumalbumin	Behringwerke Marburg
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan	Boehringer Mannheim

Alle nicht genannten Chemikalien in der jeweils reinsten Form (p. A.) stammten von der Firma Merck, Darmstadt.

2.4 Nähr- und Reagenzlösungen

2.4.1 Hanks' Lösung

Stammlösung:	NaCl	80,00 g
	KCl	4,00 g
	$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	0,60 g
	KH_2PO_4	0,60 g
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2,00 g
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,85 g
	Aqua bidest. ad	1000 ml

Vor Gebrauch mußte diese Stammlösung mit Aqua bidest. 1:10 verdünnt und der pH-Wert mit $NaHCO_3$-Lösung auf 7,35 eingestellt werden.

2.4.2 Krebs-Ringer-Bicarbonat (KRB)-Lösung

Die verwendete KRB-Lösung setzte sich nach der Originalbeschreibung von Umbreit et al. (37) folgendermaßen zusammen:

NaCl-Lösung	0,90 % = 154 mM	100 Teile
KCl-Lösung	1,15 % = 154 mM	4 Teile
$CaCl_2$-Lösung	1,22 % = 110 mM	3 Teile
KH_2PO_4-Lösung	2,11 % = 154 mM	1 Teil
$MgSO_4$-Lösung	3,82 % = 154 mM	1 Teil
$NaHCO_3$-Lösung	1,30 % = 154 mM	21 Teile

Um diese Lösung jederzeit frisch herstellen zu können, erwies es sich als praktisch, drei voneinander getrennte Lösungen folgender Zusammensetzung zu bereiten:

Lösung A:	NaCl	69,20 g
	KCl	3,61 g
	KH_2PO_4	1,62 g
	$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	2,93 g
	gelöst in 1 l Aqua bidest.	
Lösung B:	$NaHCO_3$	21,10 g
	gelöst in 1 l Aqua bidest.	
Lösung C:	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	3,73 g
	gelöst in 1 l Aqua bidest.	

Vor Gebrauch wurden die Stammlösungen in folgenden Mengen miteinander gemischt:

Lösung A:	5 ml
Lösung B:	5 ml
Lösung C:	5 ml
Aqua bidest.	35 ml

Es schlossen sich folgende Arbeitsschritte an:
5 minütige Begasung des Lösungsgemisches mit Carbogen (95 % O_2 + 5 % CO_2), Zugabe von 2 % Rinderserumalbumin

und Einstellung des pH-Wertes auf 7,35. Dann ständ die KRB-Lösung für Inkubationszwecke zur Verfügung, es mußte nur noch jeweils die im Medium gewünschte Menge Substrat zugesetzt werden.

2.4.3 Cycling-Reagenz für die Bestimmung von NADH und NAD

Zusammensetzung:	Trispuffer (1 M, pH 8,4)	10,0 ml
	α-Ketoglutaratlsg. (1 M)	0,5 ml
	Lactatlsg. (1 M, pH 7)	10,0 ml
	ADP-Lsg. (0,1 M)	0,3 ml
	NH_4-acetatlsg. (5 M)	1,0 ml
	Aqua bidest. ad	100,0 ml

Die Lösung wurde in Portionen zu je 5 ml eingefroren, vor Gebrauch setzte man jeweils 0,2 ml Glutamat-Dehydrogenase und 5 µl Lactat-Dehydrogenase zu.

2.4.4 Cycling-Reagenz für die Bestimmung von NADPH und NADP

Zusammensetzung:	Trispuffer (1 M, pH 8,0)	10,0 ml
	α-Ketoglutaratlsg. (1 M)	0,5 ml
	G-6-P-Lsg. (0,1 M)	1,0 ml
	ADP-Lsg. (0,1 M)	0,1 ml
	Aqua bidest. ad	100,0 ml

Von dieser Lösung wurden Portionen zu je 5 ml eingefroren und kurz vor Gebrauch nach dem Auftauen setzte man jeweils 50 µl G-6-P-Dehydrogenase und 100 µl Glutamat-Dehydrogenase zu.

2.4.5 Phosphogluconat-Reagenz

Zusammensetzung:	Trispuffer (1 M, pH 8,0)	2,0 ml
	Ammoniumacetatlsg. (5 M)	0,6 ml
	EDTA-Lsg. (0,1 M)	0,1 ml
	Albuminlsg. (10 %)	0,2 ml
	6-PG-Dehydrogenase	0,2 ml
	NADP-Lsg. (1,6 mg/ml)	1,0 ml
	Aqua bidest. ad	100,0 ml

Bei Zimmertemperatur ist diese Lösung etwa 3-4 Stunden haltbar.

2.4.6 Pyruvat-Reagenz

Zusammensetzung:	Imidazolpuffer (1 M, pH 6,2)	0,8 ml
	NADH-Lsg. (5 mM)	0,1 ml
	Lactat-Dehydrogenase	1,0 ml
	Aqua bidest. ad	10,0 ml

Das Reagenz sollte erst unmittelbar vor Gebrauch hergestellt werden.

2.4.7 Reaktionsgemisch zur Glucose-6-phosphat-Bestimmung

Zusammensetzung:	Tris (2 mmol)	242 mg
	NADP-Lsg. (25 mM)	20 µl
	Albumin	10 mg
	Aqua bidest. ad	100 ml

Die Lösung wird mit konz. HCl auf pH 8 eingestellt und in Portionen zu je 1 ml eingefroren, die erst kurz vor Gebrauch aufgetaut und mit jeweils 1 µl Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase versetzt werden.

2.4.8 Reaktionsgemisch zur 6-Phosphogluconat-Bestimmung

Zusammensetzung:		
	Tris (30 mmol)	3630,0 mg
	NADP	1,2 mg
	Albumin	200,0 mg
	Aqua bidest. ad	100,0 ml

Die Lösung wird mit konz. HCl auf pH 8,4 eingestellt und in Portionen zu je 1 ml eingefroren, die erst kurz vor Gebrauch aufgetaut und mit je 5 µl 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase versetzt werden.

2.4.9 Cycling-Reagenz zur G-6-P- und 6-PG-Bestimmung

Zusammensetzung:		
	Tris (20 mmol)	2420,0 mg
	α-Ketoglutarsäure	73,0 mg
	Glucose-6-phosphat	30,4 mg
	ADP	14,2 mg
	Ammoniumacetat	193,0 mg
	Albumin	20,0 mg
	Aqua bidest. ad	100,0 ml

Für die Glucose-6-phosphat-Bestimmung wird mit konz. HCl auf pH 8,4, für die 6-Phosphogluconat-Bestimmung auf pH 8,2 eingestellt.
Die Lösung wird in Portionen zu je 5 ml eingefroren, die kurz vor Gebrauch aufgetaut und mit je 25 µl Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und 13 µl Glutamat-Dehydrogenase versetzt werden.

2.5 Standardlösungen und deren Gehaltsbestimmung

2.5.1 NADPH-Standard

Zusammensetzung:	NADPH (5 nmol)	5,5 mg
	Carbonatpuffer (pH 10,6)	0,9 ml

Zusammensetzung des Puffers:

Na_2CO_3	850,0 mg
$NaHCO_3$	170,0 mg
Aqua bidest. ad	100,0 ml

Gehaltsbestimmung des Standards:

Das Prinzip der Gehaltsbestimmung (38) beruht auf einer enzymatischen Reaktion, die photometrisch ausgewertet wird:

$$\text{NADPH} + \alpha\text{-Ketoglutarat} \xrightarrow{\text{GlDH}} \text{NADP}^+ + \text{Glutamat} + H_2O$$

Mit der Umsetzung von NADPH zu $NADP^+$ ist ein Extinktionsabfall verbunden, der bei 340 nm gemessen wird.

Direkt in eine Küvette werden pipettiert:

Standardlösung	60 µl
Puffergemisch	3 ml

Zusammensetzung des Puffergemisches:

Trispuffer (1 M, pH 8)	1 ml
α-Ketoglutarsäurelsg. (146 mg/ml)	10 µl
Ammoniumacetatlsg. (385 mg/ml)	50 µl
Aqua bidest. ad	10 ml

Die Extinktionsabnahme ΔE wird nach Zugabe von 6 µl Glutamat-Dehydrogenase, sobald die Reaktion in der

Küvette zum Stillstand gekommen ist, bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen.

Aus der Standardlösung wird bei jeder NADPH-Bestimmung eine Verdünnungsreihe hergestellt, die als Bezugssystem bei der Analyse dient. Konzentrationen von 2-0,25 pmol NADPH/20 µl erwiesen sich als sinnvoll.

Zunächst werden x ml Standardlösung ad 50 ml mit einer NaOH/Cystein-Lösung (40 mM/0,5 mM) verdünnt = Lösung A

Berechnung von x : $x = \frac{0{,}615 \cdot 0{,}1}{\Delta E}$ ml

Verdünnungsreihe:

Lösung:	pmol NADPH in 20 µl:	Herstellung:
B	2,00	0,5 ml Lsg. A ad 50 ml NaOH/Cystein
C	1,00	1 ml " B + 1 ml "
D	0,50	1 ml " C + 1 ml "
E	0,25	1 ml " D + 1 ml "

Als Leerwerte werden je 20 µl NaOH/Cystein eingesetzt.

2.5.2 NADP-Standard

Zusammensetzung: NADP-Lsg. (80 mg/ml, 100 mM) 0,1 ml
Aqua bidest. ad 10,0 ml

Gehaltsbestimmung des Standards:

Der Methodik liegt folgende Reaktion zugrunde (38):

$NADP^+$ + Glucose-6-phosphat $\xrightarrow{\text{G-6-P-DH}}$ 6-PG + NADPH + H^+

Die Bildung von NADPH bewirkt einen Extinktionsanstieg, der bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen werden kann.

Direkt in eine Küvette werden pipettiert:

Standardlösung	0,3 ml
Trispuffer (1 M, pH 8)	3,0 ml
G-6-P-Lsg. (72 mg/ml)	30,0 µl

Nach Zugabe von 10 µl Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase wird , sobald die Reaktion zum Stillstand kommt, bei einer Wellenlänge von 340 nm der Extinktionsanstieg Δ E gemessen.

Die Standardlösung wird in Portionen zu je 0,5 ml eingefroren (ca 4 Wochen haltbar). Dann wird bei jeder NADP-Bestimmung eine Verdünnungsreihe als Bezugssystem hergestellt und mitanalysiert.

x ml Standardlösung werden hierzu zunächst ad 50 ml mit einer Mischung aus 5 Teilen NaOH/Cystein (40 mM/0,5 mM) und 50 Teilen H_2SO_4/Na_2SO_4 (0,1 M/20 mM) verdünnt = Lösung A.

Berechnung von x: $x = \frac{0{,}56 \cdot 0{,}5}{\Delta E}$ ml

Verdünnungsreihe:

Lösung:	pmol NADP in 50 µl:	Herstellung:
B	2,00	0,2 ml Lsg. A ad 50 ml Mischung (s.o.)
C	1,50	1,5 ml " B + 1 ml "
D	1,00	1,0 ml " B + 1 ml "
E	0,50	1,0 ml " D + 1 ml "
F	0,25	1,0 ml " E + 1 ml "
G	0,125	1,0 ml " F + 1 ml "

Als Leerwerte dienen je 50 µl der NaOH/Cystein/H_2SO_4/Na_2SO_4-Mischung.

2.5.3 NADH-Standard

Zusammensetzung: NADH (7,5 mmol) 6,0 mg

Carbonatpuffer (0,1 M, pH 10,6) 1,5 ml

Die Lösung wird 10 min bei 60°C im Wasserbad erhitzt. Aufbewahrung im Kühlschrank.

Gehaltsbestimmung des Standards:

Das Prinzip (38) beruht auf folgender Reaktion:

$$NADH + Pyruvat + H^+ \xrightarrow{LDH} Lactat + NAD^+$$

Die Umsetzung von NADH zu NAD^+ ist mit einem Extinktionsabfall verbunden, der bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen wird.

In eine Küvette werden pipettiert:

Standardlösung 60 µl

Pyruvat-Imidazol-Lsg. 3 ml

Zusammensetzung der Pyruvat-Imidazol-Lsg.:

Imidazolpuffer (0,1 M, pH 7) 10 ml

Pyruvatlsg. (11 mg/ml) 0,1 ml

Nach Zugabe von 1 µl Lactat-Dehydrogenase wird, sobald die Reaktion in der Küvette zum Stillstand kommt, bei einer Wellenlänge von 340 nm der Extinktionsabfall ΔE gemessen.

Die Standardlösung wird für eine Verdünnungsreihe verwendet, die im Bereich von 3 - 0,5 pmol NADH/ 20 µl sich für die gegebenen Versuchsbedingungen als praktisch erwiesen hat.

Zur Herstellung der Verdünnungsreihe werden zunächst x ml

Standardlösung mit NaOH/Cystein-Lsg. (40 mM/0,5 mM) ad 50 ml verdünnt = Lösung A.

Berechnung von x : $x = \frac{0,615 \cdot 0,1}{\Delta E}$ ml

Verdünnungsreihe:

Lösung:	pmol NADH in 20 µl:	Herstellung:
B	3,0	0,75 ml Lsg. A ad 50 ml NaOH/Cystein
C	2,0	2,00 ml " B + 1 ml "
D	1,5	1,00 ml " B + 1 ml "
E	1,0	1,00 ml " C + 1 ml "
F	0,5	1,00 ml " E + 1 ml "

Als Leerwerte dienen je 20 µl NaOH/Cystein-Lösung.

2.5.4 NAD-Standard

Zusammensetzung: NAD-Lsg. (100 mM) 0,1 ml
Aqua bidest. ad 10,0 ml

Gehaltsbestimmung des Standards:

Der Bestimmung des NAD-Standards liegt folgende Reaktion (38) zugrunde:

NAD^+ + Aethanol $\xrightarrow{ADH}$ NADH + Acetaldehyd

Die Bildung von NADH geht mit einem Extinktionsanstieg einher, der bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen wird.

In eine Küvette werden pipettiert:

Puffermischung 3,0 ml
Standardlösung 0,3 ml

Zusammensetzung der Puffermischung:

Trispuffer (1 M, pH 8,4)	1 ml	Aqua bidest. ad 10 ml
Äthanol	0,4 ml	
EDTA-Lsg. (100 mM)	10 µl	

Nach Zugabe von 1 µl Alkohol-Dehydrogenase wird, sobald die Reaktion zum Stillstand gekommen ist, die Extinktionszunahme ΔE gemessen (Wellenlänge 340 nm).

Für die Verdünnungsreihe (Konzentrationen von 3 - 0,5 pmol NAD/20 µl)werden zunächst x ml mit einem Gemisch aus 5 Teilen NaOH/Cystein (40 mM/0,5 mM) und 50 Teilen H_2SO_4/Na_2SO_4 (20 mM/0,1 M) ad 50 ml verdünnt = Lösung A.

Berechnung von x : $x = \frac{0,56 \cdot 0,5}{\Delta E}$ ml

Verdünnungsreihe:

Lösung:	pmol NAD in 20 µl:	Herstellung:
B	3,0	0,75 ml Lsg. A ad 50 ml Gemisch (s.o.)
C	2,0	2,00 ml " B + 1 ml "
D	1,5	1,00 ml " B + 1 ml "
E	1,0	1,00 ml " C + 1 ml "
F	0,5	1,00 ml " E + 1 ml "

Als Leerwerte werden je 20 µl des Lösungsgemisches (s.o.) verwendet.

2.5.5 Glucose-6-phosphat-Standard

Zusammensetzung:		
	Glucose-6-phosphat (16µmol)	4,9 mg
	Aqua bidest. ad	100,0 ml

Gehaltsbestimmung des Standards:

Das Prinzip der Gehaltsbestimmung (39) beruht auf einer enzymatischen Reaktion und zwar der Umsetzung von Glucose-6-phosphat mit $NADP^+$ und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconolacton unter Bildung von NADPH, welches photometrisch bestimmt wird:

$$G\text{-}6\text{-}P + NADP^+ \xrightarrow{G\text{-}6\text{-}P\text{-}DH} NADPH + 6\text{-}PG\text{-}Lacton + H^+$$

$$6\text{-}PG + H_2O$$

Direkt in eine Küvette werden pipettiert:

Standardlösung	1 ml
$MgCl_2$-Lsg. (0,1 g/ml)	20 µl
NADP-Lsg. (20 mg/ml)	20 µl
Pufferlösung	1 ml

Zusammensetzung der Pufferlösung:

Triäthanolamin	1,86 g
Aqua bidest. ad	20,00 ml

mit ca 0,6 ml 6 N NaOH auf pH 7,6 einstellen,

Aqua bidest. ad	25,00 ml

Der Extinktionsanstieg wird nach Zugabe von 10 µl Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, sobald die Reaktion in der Küvette zum Stillstand gekommen ist, bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen.
Konzentration der Standardlösung: $\Delta E \cdot 0{,}336$ µmol/ml.

Die Standardlösung wird in Portionen zu je 2 ml eingefroren (ca 4 Wochen haltbar), die dann bei der G-6-P-Bestimmung als Ausgangslösung für die Herstellung einer Verdünnungsreihe eingesetzt werden. Unter den in Abschnitt 2.8 und 2.9 angegebenen Bedingungen erwies es sich als sinnvoll, eine Verdünnungsreihe von 10 - 0,625 pmol G-6-P/ 5 µl herzustellen.
Zunächst werden x ml Standardlösung mit HCl (15 mM) ad 100 ml verdünnt =Lösung A.

Berechnung von x : $x = \frac{0{,}476 \cdot 1{,}25}{\Delta E}$ ml

Verdünnungsreihe:

Lösung:	G-6-P : pmol/5 µl	Herstellung:
B	5,000	1 ml Lsg. A + 1 ml HCl (15 mM)
C	2,500	1 ml Lsg. B + 1 ml "
D	1,250	1 ml Lsg. C + 1 ml "
E	0,625	1 ml Lsg. D + 1 ml "

Als Leerwerte werden je 5 µl HCl (15 mM) eingesetzt.

2.5.6 6-Phosphogluconat-Standard

Zusammensetzung: 6-PG (16 µmol) 6,05 mg
Aqua bidest. ad 100,00 ml

Gehaltsbestimmung des Standards:

Das Prinzip der 6-PG-Bestimmung ist dem der G-6-P-Gehaltsbestimmung gleich (40). Auch hier wird nach einer enzymatischen Reaktion die dem 6-PG äquivalente Menge NADPH quantitativ photometrisch bestimmt.

$$6\text{-PG} + NADP^+ \xrightarrow{\text{6-PG-DH}} CO_2 + \text{Ribulose-5-P} + NADPH + H^+$$

Direkt in eine Küvette werden pipettiert:

Standardlösung	1,0 ml
Pufferlösung	1,5 ml
NADP-Lsg. (10 mg/ml)	100,0 µl

Zusammensetzung der Pufferlösung:

Triäthanolamin	1,86 g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0,10 g
Aqua bidest. ad	40,0 ml
mit ca 3,6 ml 1 N NaOH auf pH 7,6 einstellen,	
Aqua bidest. ad	50,0 ml

Der Extinktionsanstieg ΔE wird nach Zugabe von 20 µl 6-PG-DH, sobald die Reaktion in der Küvette zum Stillstand gekommen ist, bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen.

Konzentration der Standardlösung = $\Delta E \cdot 0{,}437$ µmol/ml

Die Standardlösung wird in Portionen von je 1,5 ml eingefroren (ca 4 Wochen haltbar) und dann bei der Phosphogluconat-Bestimmung als Ausgangslösung zur Herstellung einer Verdünnungsreihe für die Bezugsgerade benutzt. Unter den gegebenen Bedingungen erwiesen sich Konzentrationen von 5 - 0,3125 pmol 6-PG/6 µl als sinnvoll.

Verdünnungsreihe:

Lösung:	6-PG : pmol/6 µl	Herstellung:
A	10,0000	x ml Stand. + 100 ml HCl (40 mM)
B	5,0000	1 ml Lsg. A + 1 ml "
C	2,5000	1 ml " B + 1 ml "
D	1,2500	1 ml " C + 1 ml "
E	0,6250	1 ml " D + 1 ml "
F	0,3125	1 ml " E + 1 ml "

Als Leerwerte werden je 6 µl HCl (40 mM) eingesetzt.

Berechnung von x : $x = \frac{0{,}366 \cdot 1{,}04}{\Delta E}$ ml

2.6 Isolierung der Langerhansschen Inseln nach Lacy und Kostianovsky (41)

Bei der mit Äther narkotisierten Ratte wurde durch einen Längsschnitt bis zum Brustbein und je einem Querschnitt im Becken und unter den Rippenbögen das Abdomen geöffnet. Unter den Leberlappen wurde das Duodenum mit einer Pinzette hervorgezogen, um den Ductus pancreaticus sichtbar zu machen und um ihn zur Leber hin abbinden zu können. Anschließend injizierte man 10 ml eisgekühlte Hanks' Lösung durch den Ductus pancreaticus in das Pankreas. Mit einer Schere ließ sich sodann das deutlich sichtbare Pankreas von Darm, Magen, Milz und Leber abtrennen, in eine mit Hanks' Lösung gefüllte Petrischale legen und von sämtlichen Fettpartikeln befreien.

Die Zerkleinerung des Pankreas erfolgte mittels einer kleinen Schere möglichst gleichmäßig und so fein, daß sich die Teilchen mit dem Konus einer 5 ml Recordspritze aufsaugen ließen.

Das Volumen wurde mit Hanks' Lösung auf 5 ml ergänzt und der gesamte Inhalt der Spritze dann in ein 20 ml Schnappdeckelglas überführt, das 30 mg Collagenase enthielt. In einem bei 38°C thermostatisierten Schüttelbad ließ man die Collagenase unter kräftigem Schütteln so lange auf das Pankreasgewebe einwirken, bis eine homogene, hellbraune schleimige Flüssigkeit entstanden war (ca 8 - 10 min, je nach Aktivität der Collagenase und Größe der Pankreaspartikel).

Anschließend wurde der gesamte Inhalt in ein kleines Becherglas eingefüllt, 3-mal durch den Konus der 5 ml

Recordspritze gesaugt (zur weiteren Zerkleinerung) und durch ein Plastiksieb in einen mit ca.15 ml eiskalter Hanks' Lösung gefüllten Meßzylinder gegossen. Auf diese Weise wurde die Collagenasereaktion gestoppt.
Wegen der unterschiedlichen Dichte von exokrinen Partikeln und Inseln war es möglich, beide voneinander zu trennen und zwar indem man die Inseln absetzen ließ, den Überstand absaugte und erneut mit eiskalter Hanks' Lösung aufschwemmte. Dieser Vorgang wurde ca.8 mal wiederholt, bis der größte Teil des exokrinen Gewebes entfernt war und sich die isolierten Inseln am Boden des Gefäßes mikroskopisch erkennen ließen. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 0°C. Durch sorgfältiges Auslesen mit einer Mikropipette unter dem Stereomikroskop gelang es, die Inseln vollständig vom exokrinen Gewebe zu trennen und der Vorinkubation zuzuführen.

2.7 Vorinkubation

Die isolierten Pankreasinseln wurden in ein 5 ml Gläschen gebracht, 2 ml KRB-Lösung, die 2 % Rinderalbumin und 0,3 mg/ml Glucose enthielt, daraufpipettiert und das Glas mit einem Gummistopfen verschlossen. Über eine Kanüle wurde während der nun folgenden 30 minütigen Inkubation bei 37°C im Schüttelbad mit Carbogen begast. Die Vorinkubation diente der Stoffwechselregeneration nach dem Isolierungsprozeß. Die Inseln wurden nun 3 mal mit eiskalter Hanks' Lösung gewaschen.

2.8 Hauptinkubation

Je 5 bzw. 10 Inseln wurden in 2 ml Reagenzgläser einsortiert und entsprechend dem jeweiligen Inkubationsschema, das aus den Tabellen im Anhang ersichtlich ist, 0,7 ml, 1 ml oder 2 ml KRB-Albumin-Lösung, in der die entsprechende Menge Substrat gelöst war, zupipettiert. Es folgte die Hauptinkubation (Dauer siehe Tabellen) bei 37°C unter Begasung und langsamem Schütteln.
Nach Beendigung der Inkubation wurden alle Gläschen sofort in ein Eisbad gestellt, um Stoffwechselvorgänge weitgehend zu unterbinden. Danach ließ man 5 min bei 2000 U/min zentrifugieren, wobei die Zentrifuge auf 2°C vorgekühlt sein mußte. Die Inseln wurden gezählt, 100 µl vom Überstand für die Insulinbestimmung abgenommen und eingefroren und der Rest des Überstandes abgesaugt, bis die Inseln völlig trocken erschienen. In diesem Zustand wurden die Inseln nochmals gezählt, um Absaugverluste berücksichtigen zu können, und dann entsprechend der Vorschrift zur Bestimmung der Inhaltsstoffe aufgelöst.

2.9 Meßmethoden

2.9.1 Insulinbestimmung

Die Messung der Insulinkonzentration im Hauptinkubationsmedium erfolgte in Doppelbestimmungen durch Radioimmunoassay (Doppelantikörpermethode (42)) und zwar auf der Basis des Radioimmunoassay Kit (INSIK-I^{R}). Zur Erstellung der Eichkurve verwendete man Ratteninsulin. Den zu bestimmenden Proben sowie den Standardinsulinlösungen wurden

jeweils 10 µl entnommen und 1:10 mit Puffer folgender Zusammensetzung verdünnt:

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	550 mg
Rinderalbumin	1 g
Aqua bidest. ad	100 ml

Als Leerwert legte man 100 µl Puffer (pH 7,4) vor. Anschließend wurde der lyophilisierte Antikörperkomplex laut Vorschrift gelöst und jeweils 100 µl davon den Proben zugefügt. Nach sorgfältigem Schütteln verblieben alle Proben für 6 Stunden bei 4°C im Kühlschrank. Nach der Zugabe von jeweils 100 µl des gelösten Jod-125-markierten Insulins verblieben die Proben wiederum bei 4°C im Kühlschrank, dieses Mal 18 Stunden lang. Dann setzte man allen Gläschen 1 ml kalten Puffer zu und zentrifugierte 20 min lang mit 3500 U/min bei 4°C. Der Überstand wurde sofort abgekippt und die Zentrifugenröhrchen umgekehrt aufgestellt, um die am oberen Rand noch anhaftenden Tröpfchen ablaufen zu lassen. Dann folgte die Messung im automatischen Gamma-Counter (1 min lang).

Berechnung der Insulinwerte:

Aus den Doppelbestimmungen ließ sich der Mittelwert der Zählerrate errechnen. Es wurde dann der Quotient gebildet aus der jeweiligen Zählrate der Proben und der ermittelten Zählrate des Leerwertes. Anhand einer ebenfalls auf diese Weise erstellten Eichkurve, im Bereich von 0-2000 µE, konnten die Insulinwerte der Proben mit einem entsprechenden Computerprogramm errechnet werden.

2.9.2 Bestimmung der Pyridinnucleotide

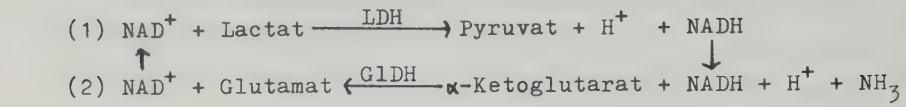
Aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Mengen an Material war es nicht möglich, eine direkte Meßmethode zur Bestimmung der Pyridinnucleotide anzuwenden, sondern es war nötig, die zu bestimmenden Substanzen in einem enzymatischen Cyclingprozeß anzureichern.
Dem Verfahren liegt die Methode nach Passonneau und Lowry zugrunde (38), die es ermöglicht, NADPH, NADP, NADH und NAD nebeneinander getrennt zu bestimmen. In den Cycling-Reaktionen wirken die Nucleotide als Katalysatoren einer enzymatischen Dismutation zwischen zwei Substraten. Die Nucleotid-Konzentrationen sind in diesen Reaktionen weit unterhalb ihrer K_M-Werte, folglich sind die Reaktionsgeschwindigkeiten proportional der Nucleotid-Konzentration. Nach einigen Tausend Zyklen wird eines der Produkte gemessen.

Es werden zwei verschiedene Cycling-Methoden verwendet: Zur Bestimmung von NADP und NADPH setzt man Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase ein und Glutamat-Dehydrogenase, zur Bestimmung von NAD und NADH werden Lactat-Dehydrogenase und Glutamat-Dehydrogenase zugegeben. Die oxidierten Coenzyme können bestimmt werden, nachdem die reduzierten (und störende Enzyme) durch Säurebehandlung zerstört wurden. Die reduzierten Coenzyme können bestimmt werden, nachdem die oxidierten (und störende Enzyme) durch mildes Alkali zerstört wurden.

2.9.2.1 Bestimmung von NAD und NADH

Prinzip

Folgender Reaktionszyklus läuft ab:



Das zu bestimmende NAD^+ setzt sich mit Lactat zu Pyruvat und NADH um. Das so gebildete bzw. das zu bestimmende NADH geht in die Reaktion (2) ein. Dadurch entsteht ein Reaktionszyklus, in dem pro Zeiteinheit eine bestimmte Menge Pyruvat gebildet wird, die der Pyridinnucleotidkonzentration proportional ist. Wenn man, wie in diesem Fall, 60 Minuten lang bei 25°C zyklisieren läßt, erhält man aus einem Molekül NAD ca. 6000 Moleküle Pyruvat. Das so gebildete Pyruvat wird nun mit neu zugefügtem NADH durch Lactat-Dehydrogenase zu Lactat und NAD umgesetzt, letzteres wird fluorimetrisch quantitativ bestimmt.

Versuchsablauf

NADH-Bestimmung:

Die inkubierten und trockengesaugten Inseln (durchschnittlich 10 pro Glas) werden in je 20 µl eines NaOH (40 mM)-Cystein (0,5 mM)-Gemisches gelöst und die Proben zusammen mit Standardproben, die genau eingestellte Konzentrationen an NADH ebenfalls in einem NaOH-Cystein-Gemisch enthalten und als Bezugswerte bei der Messung dienen, 15 Minuten bei 60°C im Wasserbad erhitzt, um gleichzeitig vorhandenes störendes NAD zu zerstören.

Jede wieder abgekühlte Probe wird dann mit je 100 µl Cycling-Reagenz versetzt und 60 Minuten bei 25°C im Wasserbad inkubiert. Zur Beendigung des Cycling-Prozesses werden alle Proben 2 min in kochendem Wasser erhitzt. Nach dem Abkühlen werden jeweils 0,1 ml Pyruvat-Reagenz hinzugefügt, welches 15 min bei Raumtemperatur einwirken muß. Durch Zugabe von je 25 µl 5 N HCl wird überschüssiges NADH zerstört, dann wird mit 1 ml 5 N NaOH alkalisiert und noch 10 min bei 60°C im Wasserbad erhitzt. Nach Temperaturausgleich erfolgt die fluorimetrische Messung von NAD, das sich entsprechend der Pyruvatmenge gebildet hat. Anregungswellenlänge 365 nm, Messung bei 460 nm

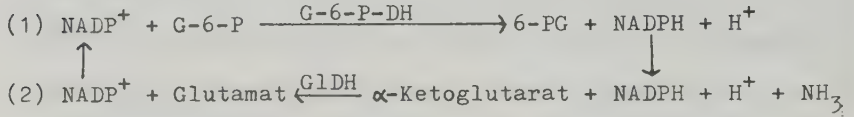
NAD-Bestimmung:

Je 10 inkubierte und trockengesaugte Inseln wurden in 10 µl eines NaOH (40 mM)-Cystein (0,5 mM)-Gemisches gelöst und mit 100 µl H_2SO_4 (20 mM)-Na_2SO_4 (0,1 M)-Lösung versetzt, jeweils aus einem Glas zweimal 20 µl entnommen, um eine Doppelbestimmung aus jedem Inselansatz durchführen zu können, und dann anschließend noch 30 min lang im Wasserbad bei 60°C erhitzt, um das im Inselhomogenat anwesende NADH im sauren Milieu völlig zu zerstören. Ebenfalls erhitzt werden die Standardproben, die genaue Mengen NAD enthalten und als Bezugswerte dienen sollen.
In allen weiteren Schritten wird die Bestimmung des NAD analog der NADH-Bestimmung durchgeführt.
Zur Erstellung der jeweiligen Eichkurven erwiesen sich Konzentrationen von 0,5 pmol - 3 pmol NAD bzw. NADH jeweils in 20 µl eines Gemisches, das dem entspricht, in dem sich die Inseln befinden.

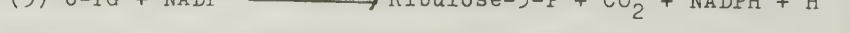
2.9.2.2 Bestimmung von NADP und NADPH

Prinzip

Es läuft folgender Reaktionszyklus ab:



Das zu bestimmende NADP setzt sich mit Glucose-6-phosphat zu NADPH um (1). Dieses NADPH geht in die Reaktion (2) ein. Dadurch entsteht wiederum ein Reaktionszyklus, in dem pro Zeiteinheit eine bestimmte Menge 6-Phosphogluconat gebildet wird, die der eingesetzten NADPH- bzw. NADP-Konzentration proportional ist. Auf diese Weise erhält man bei einer Reaktionsdauer von 60 min aus einem Molekül NADP ca. 10 000 - 20 000 Moleküle 6-Phosphogluconat. Das gebildete 6-PG setzt sich in einer weiteren Reaktion (3) zu Ribulose-5-phosphat und NADPH um, letzteres wird anschließend fluorimetrisch quantitativ gemessen.



Versuchsablauf

NADPH-Bestimmung:

Nach der Hauptinkubation werden die trockengesaugten Inseln, jeweils 10 pro Glas, in je 20 µl NaOH-Cystein-Lösung gelöst und dann 15 min bei 60°C im Wasserbad erhitzt, um gleichzeitig vorhandenes NADP zu beseitigen.

Zur Erstellung einer Eichkurve erwies sich eine Verdünnungsreihe folgender Konzentrationen als günstig:
0,25 pmol, 0,5 pmol, 1 pmol, 1,5 pmol, 2 pmol und 3 pmol NADPH jeweils in 20 µl NaOH-Cystein-Lösung. Die Standardproben werden genauso behandelt wie die Proben mit aufgelösten Inseln.
Nach dem Erhitzen werden alle Proben wieder abgekühlt und mit jeweils 100 µl Cycling-Reagenz versetzt. Es folgt die Cycling-Inkubation eine Stunde lang bei 38°C im Wasserbad, die dann durch 2 minütiges Erhitzen in kochendem Wasser abgestoppt wird. Nach dem Abkühlen setzt man jeweils 2 ml Phosphogluconat-Reagenz zu, durchmischt gut und zentrifugiert bei 3000 U/min 10 min lang. Nach einer Reaktionsdauer von 30 min bei Raumtemperatur erfolgt die fluorimetrische Messung von NADPH im Überstand, das sich entsprechend der 6-PG-Menge gebildet.
Anregungsstrahlung = 365 nm, Messung bei 460 nm.

NADP-Bestimmung:
Die inkubierten und trockengesaugten Inseln (je 10 pro Glas) werden in 10 µl NaOH-Cystein-Lösung gelöst und mit 100 µl H_2SO_4 (20 mM)-Na_2SO_4 (0,1 M)-Lösung versetzt. Der Säurezusatz bewirkt eine Zerstörung des anwesenden NADPHs, zum selben Zweck wird anschließend noch 30 min bei 60°C im Wasserbad erhitzt.
Für die Eichkurve erwies sich eine Verdünnungsreihe folgender Konzentrationen als günstig:
0,125 pmol, 0,25 pmol, 0,5 pmol, 1 pmol, 1,5 pmol und 2 pmol NADP jeweils in 50 µl des Cystein-NaOH-H_2SO_4-Na_2SO_4-Gemisches.

Aus den Gläsern mit den aufgelösten Inseln werden zweimal 50 µl herausgenommen, um so mit einem Inselansatz jeweils zwei Bestimmungen durchführen zu können.
Nach dem Erhitzen der Proben wird wieder abgekühlt und zur Durchführung des Cycling-Prozesses werden jeweils 250 µl Cycling-Reagenz zugefügt.
Alle weiteren Schritte der Bestimmung gleichen genau denen zur NADPH-Bestimmung.

2.9.3 Bestimmung von Glucose-6-phosphat

Nach einer Methode von Lowry et al. (43) ist es möglich, Metaboliten in Konzentrationen, die mit direkten Methoden nicht meßbar sind, quantitativ zu bestimmen und zwar gelangt hier wiederum das in Abschnitt 2.9.2 beschriebene Cycling-Verfahren zur Anwendung.
Bei der Bestimmung von Glucose-6-phosphat geht dem eigentlichen Cycling-Prozeß eine Reaktion voraus, bei der sich dem G-6-P äquivalente Mengen NADPH bilden:

$$\text{G-6-P} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{G-6-P-DH}} \text{6-PG} + \text{NADPH}$$

Das NADPH geht nun in den in Abschnitt 2.9.2.2 beschriebenen Reaktionszyklus ein, d. h. es kommt zu einer Anreicherung einer dem NADPH äquivalenten Menge 6-PG. Dieses wird wiederum mit $NADP^+$ und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase zu Ribulose-5-phosphat und NADPH umgesetzt, letzteres kann fluorimetrisch bestimmt werden.

Durchführung:
Je 10 Inseln werden nach der Inkubation in ein verschließbares Eppendorfgefäß (nach unten verjüngtes Reaktionsgefäß aus Polyäthylen, 1,5 ml Vol.) überführt, dort trockengesaugt und

in je 5 µl HCl (15 mM) gelöst. Zusammen mit den Standardproben (3 Proben je Konzentration) folgt 20 minütiges Erhitzen der gut verschlossenen Gefäße bei 75°C im Wasserbad, um bereits vorhandenes NADPH im sauren Milieu zu zerstören. Nach dem Abkühlen wird der Inhalt der Gefäße mit je 15 µl Reaktionsgemisch (2.4.7) unter Zuhilfenahme eines Mikromixers vermengt. Um sicherzugehen, daß der gesamte Inhalt des Gefäßes mit dem Reagenz in Kontakt kommt, wird bei 2000 U/min kurz zentrifugiert. Nach 15 - 20 min langer Reaktion bei Raumtemperatur soll die Zugabe von je 15 µl 0,1 N NaOH und anschließendes Erhitzen, 10 min bei 60°C im Wasserbad, bewirken, daß überschüssiges NADP zerstört wird.
Auch bei diesem Schritt sichert kurzes Zentrifugieren nach Zugabe der Natronlauge eine vollständige Verteilung ab.
Nun schließt sich der Cycling-Prozeß an:
Nach dem Abkühlen der Proben werden je 100 µl Cycling-Reagenz (2.4.9) zupipettiert, es wird wieder gemixt und kurz zentrifugiert, dann folgt eine 60 minütige Inkubation bei 38°C im Wasserbad. Die Reaktion wird durch 2 Minuten langes Erhitzen in kochendem Wasser gestoppt.
Zu den abgekühlten Proben wird je 1 ml Phosphogluconat-Reagenz (2.4.5) gegeben, alles Weitere folgt wie im Abschnitt über die NADPH-Bestimmung beschrieben.
Die höchste Konzentration der Standardreihe (10 pmol/ 5 µl) erreichte unter den gegebenen Bedingungen bei einer Verstärkung des Fluorimeters auf Coarse 300/ fine 9 100 % Transmission, der Leerwert betrug bei dieser Einstellung durchschnittlich 16 %.

2.9.4 Bestimmung von 6-Phosphogluconat

Die Bestimmung läuft nach dem gleichen Prinzip ab wie die Glucose-6-phosphat-Messung (43). Vor dem Cycling-Prozeß steht hierbei die Umsetzung mit $NADP^+$ und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase zu Ribulose-5-phosphat und NADPH.

$$6\text{-PG} + NADP^+ \xrightarrow{\text{6-PG-DH}} \text{Ribulose-5-P} + CO_2 + NADPH + H^+$$

Alle weiteren Reaktionen gleichen den in Abschnitt 2.9.3 beschriebenen.

Durchführung:
Die Inkubation kann in verschließbaren Eppendorfgefäßen durchgeführt werden. Die Inseln (je 5 pro Gefäß) werden trockengesaugt und in je 6 µl HCl (40 mM) gelöst. Die Zerstörung von bereits vorhandenem NADPH geschieht durch 20 Minuten langes Erhitzen bei 75°C im sauren Milieu. Nach dem Abkühlen der Proben werden je 6 ul Reaktionsgemisch zupipettiert (2.4.8). Es folgt sorgfältiges Durchmischen mit einem Mikromixer und anschließend kurzes Zentrifugieren bei 2000 U/min. Das Reagenz soll dann 30 min bei Raumtemperatur einwirken. Dann wird durch Erhitzen mit je 6 µl NaOH (0,5 N), 20 min bei 75°C, eine Zerstörung überschüssigen NADPs bewirkt. Wiederum müssen die Proben ganz abkühlen, bevor das Cycling-Reagenz, je 100 µl, zugegeben wird. Alle weiteren Schritte erfolgen analog der G-6-P-Bestimmung.
Mit der beschriebenen Methode erreichte der Bezugswert mit der höchsten Konzentration (5 pmol/6 µl) den 100 % Transmissionswert bei einer Verstärkung des Fluorimeters auf Coarse 1K/ fine 2. Der Leerwert betrug durchschnittlich 65 %

2.10 Versuchsauswertung

Alle angegebenen Werte stellen Mittelwerte ± SEM dar, errechnet aus der in den Abbildungen angegebenen Anzahl (n) der Versuche.
Für die Prüfung auf Signifikanz der Unterschiede von Mittelwerten wurde der Student-t-Test angewandt.

2.11 Darstellung der Ergebnisse

Die Ergebnisse wurden zur optischen Veranschaulichung in Abbildungen dargestellt.
Die tabellarische Zusammenstellung der Werte im Anhang soll der exakten zahlenmäßigen Information dienen.

3. Versuchsergebnisse

3.1 Leucin

3.1.1 Einfluß von Leucin und Glucose auf den Gehalt an NADPH und NADP sowie auf die Insulinsekretion

Unter den in unserem Labor bisher zur Bestimmung von Pyridinnucleotiden üblichen Bedingungen wurde zunächst geprüft, ob Leucin den Gehalt an NADPH und NADP in isolierten Inseln des Rattenpankreas beeinflußt.

Abb. 1 zeigt den Einfluß von Leucin auf den NADPH- und NADP-Gehalt isolierter Pankreasinseln der Ratte bei Inkubation von 10 Inseln in 0,7 ml Medium über einen Zeitraum von 60 min in Gegenwart von Glucose.

Bei Anwesenheit von Glucose (2 mg/ml) allein betrug der NADPH-Gehalt am Ende der Inkubation 1,17 pmol/10 Inseln, Zusatz von Leucin (10 mM) bewirkte einen signifikanten Anstieg auf 1,4 pmol/ 10 Inseln.

Der NADP-Gehalt sank demgegenüber signifikant von 1,39 pmol/10 Inseln (bei Anwesenheit von Glucose allein) nach Zusatz von Leucin auf 1,09 pmol/10 Inseln.

Die Summe aus NADPH und NADP blieb annähernd konstant.

Die Berechnung des NADPH/NADP-Quotienten ergab einen deutlichen Anstieg von 0,84 auf 1,28.

Den Einfluß von Glucose und Leucin auf die Insulinsekretion nach 90 minütiger Inkubation von je 5 Inseln in 1 ml Medium zeigt die Abb. 2.

Die, im Nachhinein betrachtet, ungünstige Versuchsanordnung, was die Inkubationsdauer anbetrifft, ist einmal darauf zurückzuführen, daß in den bisherigen Untersuchun-

gen in diesem Labor sowie in der einschlägigen Literatur jeweils nach 90 minütiger Inkubation die Insulinsekretion gemessen wurde und zum anderen darauf, daß bei Beginn diese Arbeit noch keine Ergebnisse über die Beeinflussung des NADPH-Gehaltes und der Insulinsekretion durch akkumuliertes Medium-Insulin vorlagen.

Glucose (2 mg/ml) führte nach 90 Minuten langer Inkubation zu einem signifikanten Anstieg der Insulinfreisetzung von 50 (Pufferwert) auf 590 µE IRI/ml. (Abb. 2) Leucin (10 mM) erhöhte diese freigesetzte Insulinmenge signifikant auf 1037 µE IRI/ml.

In Gegenwart von Methylenblau (2 µg/ml) kommt es, wie aus Abb. 3 hervorgeht, bei Anwesenheit von Leucin (10 mM) + Glucose (2 mg/ml) zu einer signifikanten Abnahme des NADPH-Gehaltes von 1,4 pmol/ 10 Inseln auf 0,53 pmol/10 Inseln, was noch unterhalb des NADPH-Gehaltes liegt, der bei Inkubation mit Glucose (2 mg/ml) allein zu messen war. Der NADP-Gehalt stieg bei Zusatz von Methylenblau unter gleichen Bedingungen signifikant von 1,09 auf 1,75 pmol/10 Inseln, so daß sich daraus ein Absinken des NADPH/NADP-Quotienten von 1,28 auf 0,3 ergab.

Diese Senkung des NADPH/NADP-Quotienten war, wie die Abbildungen 4 und 5 zeigen, von einer signifikanten Hemmung sowohl der durch Glucose induzierten Insulinsekretion (von 590 auf 336 µE IRI/ml) als auch der durch Leucin (10 mM) + Glucose (2 mg/ml) induzierten Insulinsekretion (von 1037 auf 615 µE IRI/ml) begleitet.

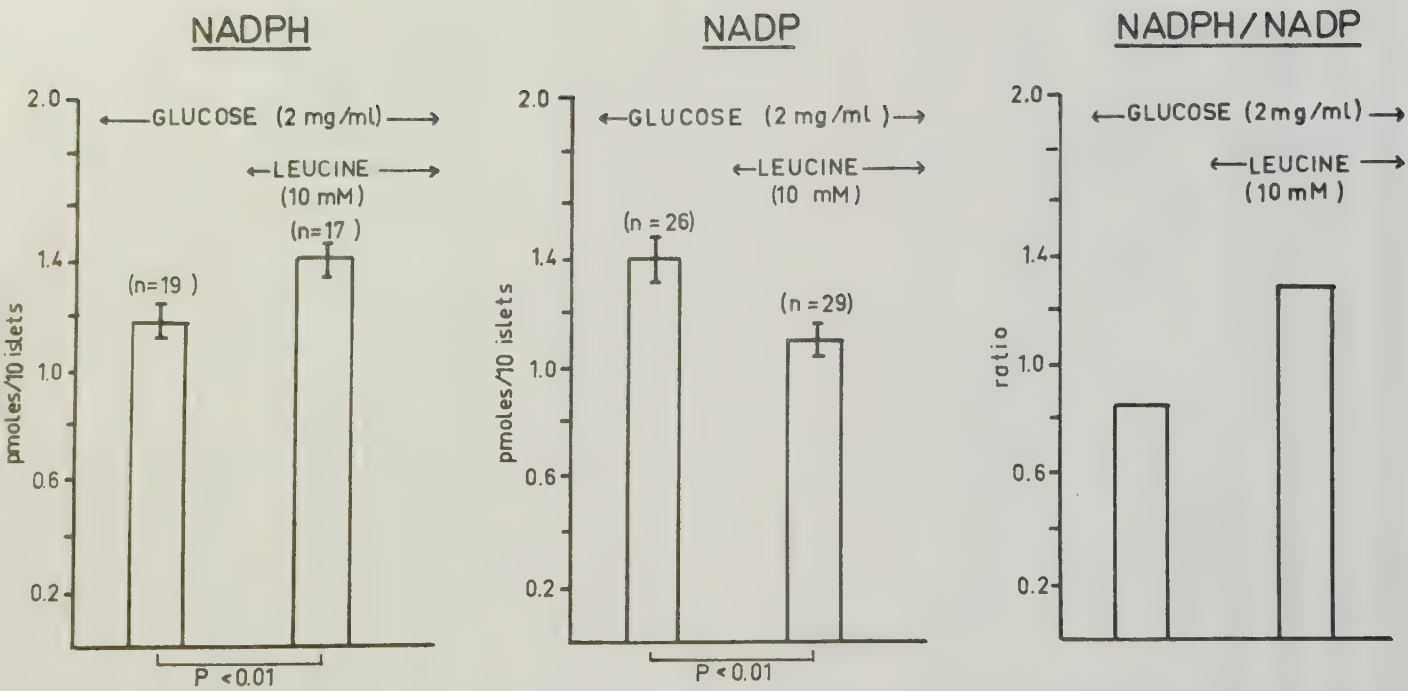


Abb. 1 : Einfluß von Leucin (10 mM) auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln der Ratte an NADPH und NADP sowie deren NADPH/NADP-Quotienten in Gegenwart von Glucose.
Je 10 Inseln wurden in 0,7 ml Medium 60 min lang inkubiert. Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche.

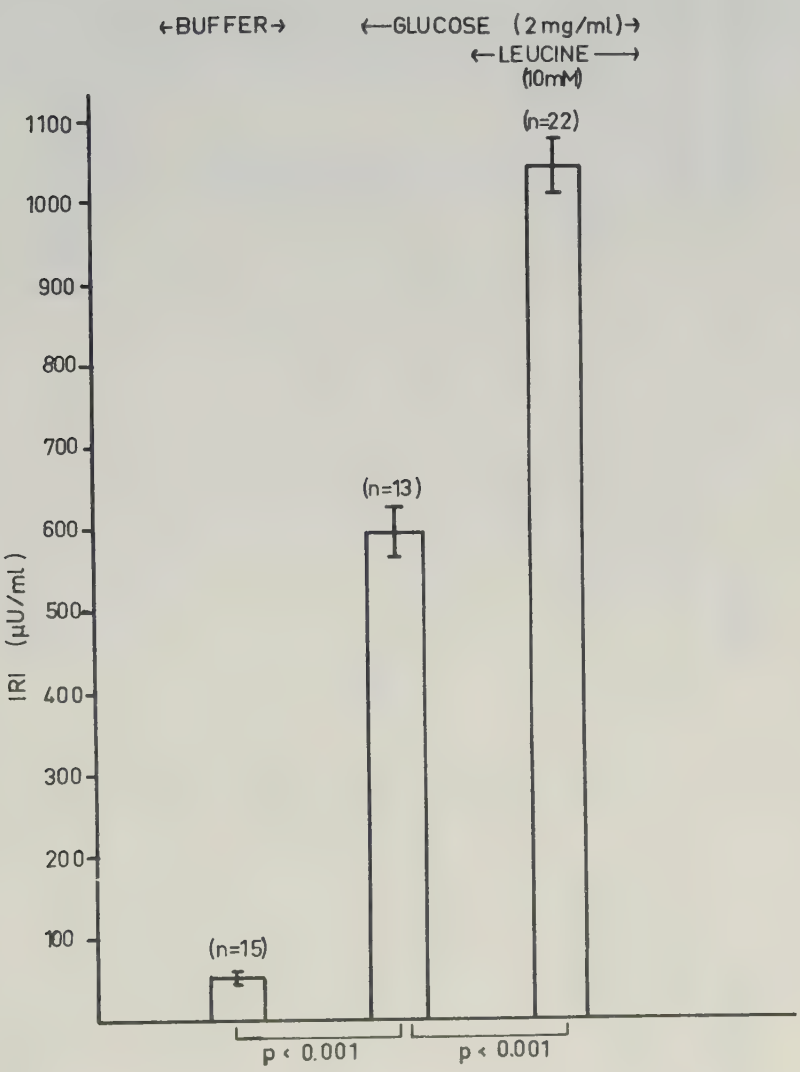


Abb. 2 : Einfluß von Glucose und Leucin auf die Sekretion von Insulin aus isolierten Pankreasinseln der Ratte. Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 90 min inkubiert. Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche

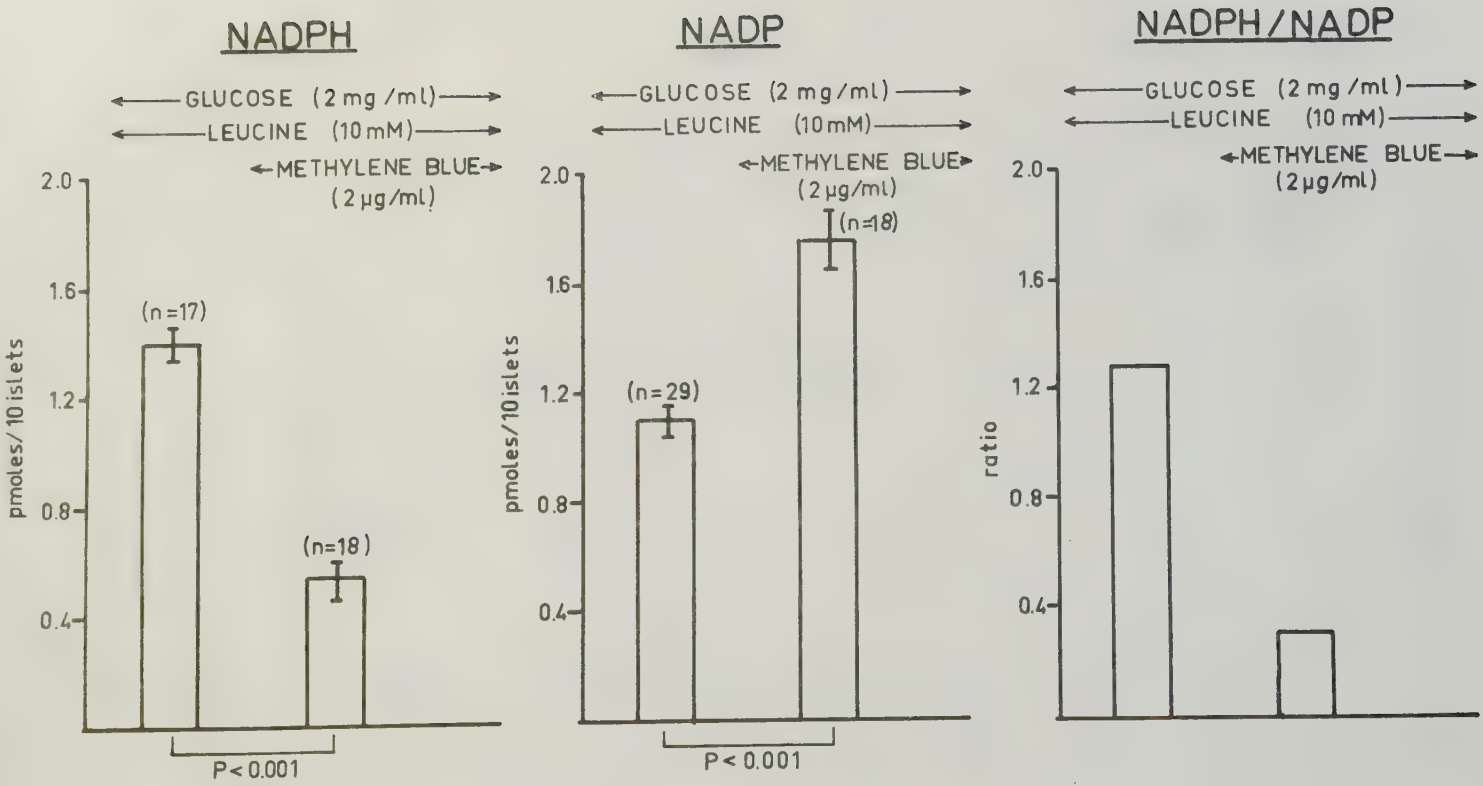


Abb. 3 : Einfluß von Methylenblau auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln der Ratte an NADPH und NADP sowie deren NADPH/NADP-Quotienten in Gegenwart von Leucin (10 mM)+Glucose (2mg/ml). Je 10 Inseln wurden in 0,7 ml Medium 60 min inkubiert. Mittelwerte + SEM;n=Anzahl d. Versuche

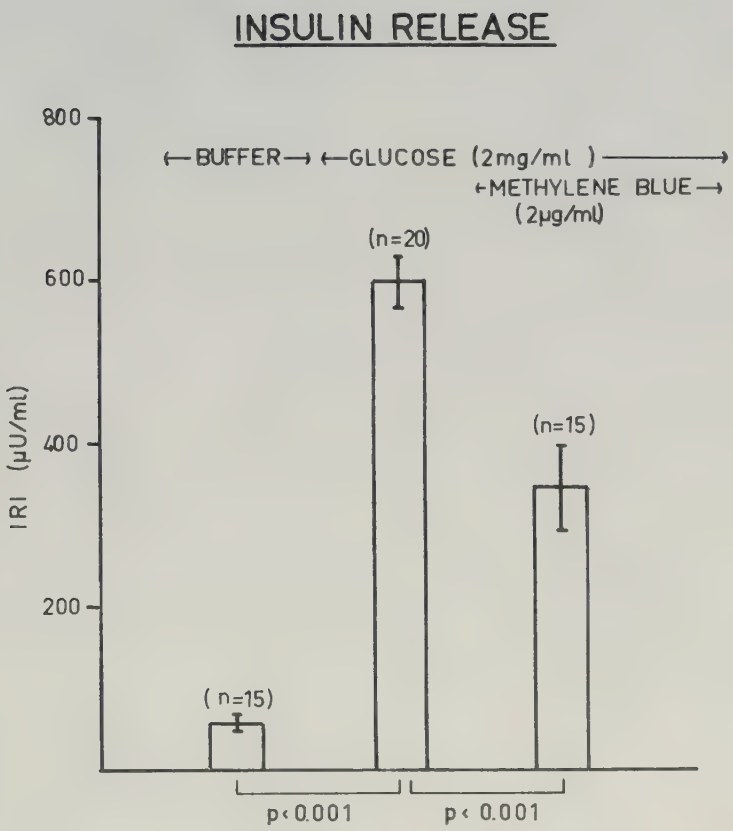


Abb. 4 : Einfluß von Glucose und Methylenblau auf die Sekretion von Insulin aus isolierten Pankreasinseln der Ratte.
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 90 min lang inkubiert. Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche

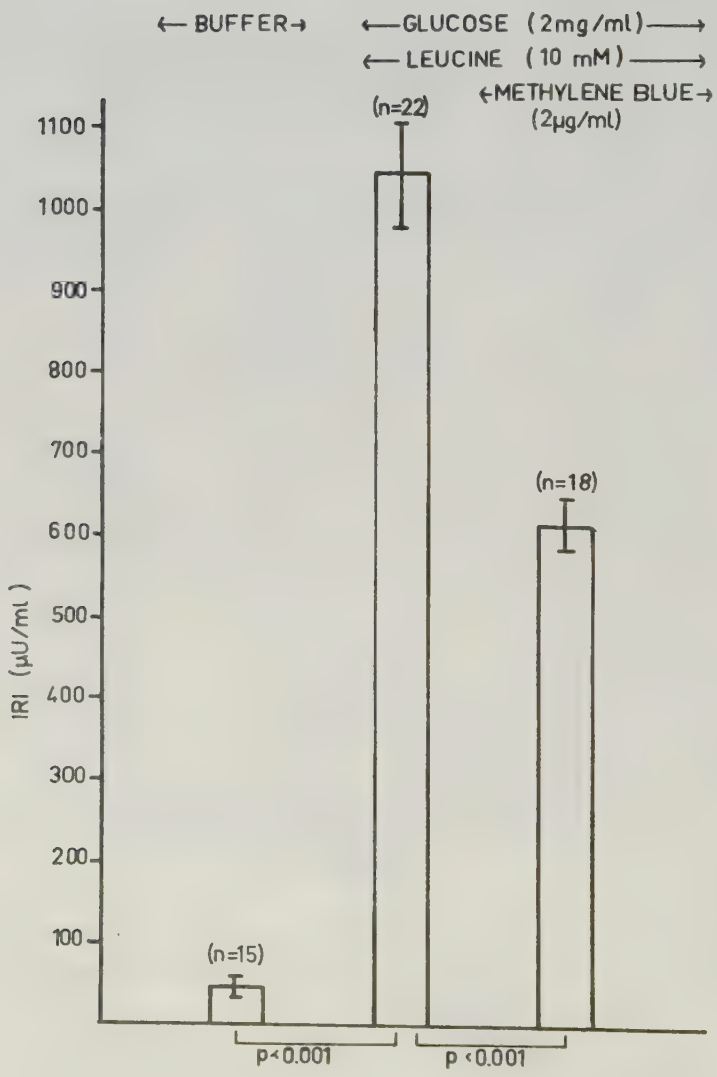


Abb. 5 : Einfluß von Methylenblau auf die Sekretion von Insulin aus isolierten Pankreasinseln der Ratte in Gegenwart von Leucin + Glucose.
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 90 min lang inkubiert. Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche

3.1.2 Einfluß von Leucin auf den NADH- und NAD-Gehalt

In dieser Versuchsserie sollte überprüft werden, ob Leucin auch auf den insulären Gehalt an NADH und NAD einen Einfluß ausübt.
Hierzu wurden je 10 Inseln in 2 ml Medium mit Leucin (10 mM) + Glucose (2 mg/ml) inkubiert.

Wie aus Abb. 6 ersichtlich ist, führte Leucinzusatz bereits nach 15 min Inkubation zu einer signifikanten Erhöhung des NADH-Gehaltes gegenüber Glucose allein von 1,26 auf 1,97 pmol/10 Inseln. Der NAD-Gehalt nahm jedoch nicht ab, so daß sich die Summe aus NADH und NAD von 6,22 auf 6,98 pmol/10 Inseln erhöhte. Bei Berechnung des NADH/NAD-Quotienten ergab sich eine deutliche Zunahme von 0,25 auf 0,39.

Im Gegensatz zu den Versuchen mit NADPH führte Methylenblau (2 µg/ml) in Gegenwart von Leucin (10 mM) + Glucose (2 mg/ml) nicht zu einer Erniedrigung des NADH-Gehaltes (Abb. 7). Es zeigt sich sogar ein leichter statistisch nicht signifikanter Anstieg an NADH von 1,97 auf 2,27 pmol/10 Inseln nach Methylenblauzusatz, dagegen sinkt der NAD-Gehalt von 5,01 auf 4,52 pmol/10 Inseln, der NADH/NAD-Quotient steigt dementsprechend von 0,35 auf 0,5.

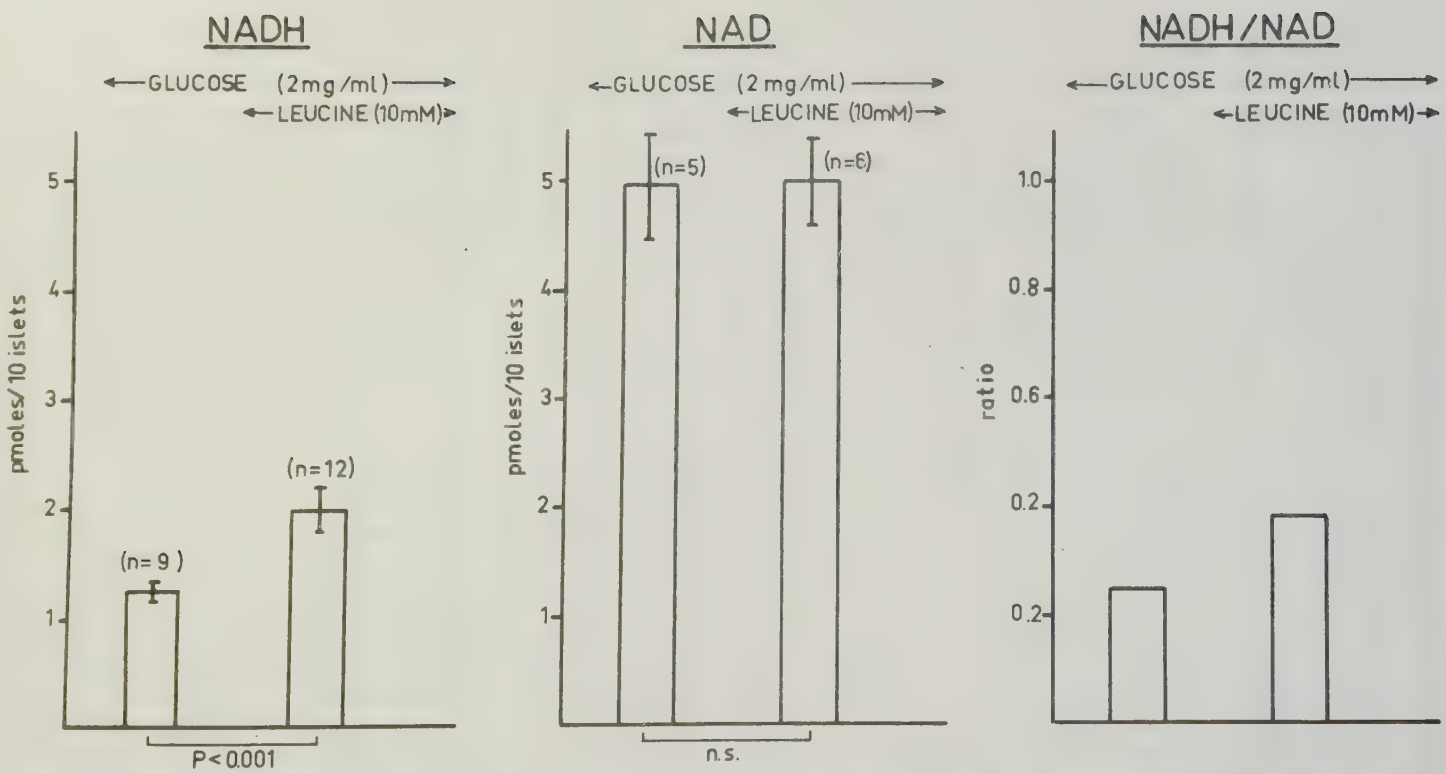


Abb. 6 : Einfluß von Leucin auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln der Ratte an NADH und NAD sowie deren NADH/NAD-Quotienten in Gegenwart von Glucose.
Je 10 Inseln wurden in 2 ml Medium 15 min lang inkubiert. Mittelwerte ± SEM; n=Anzahl d. Versuche

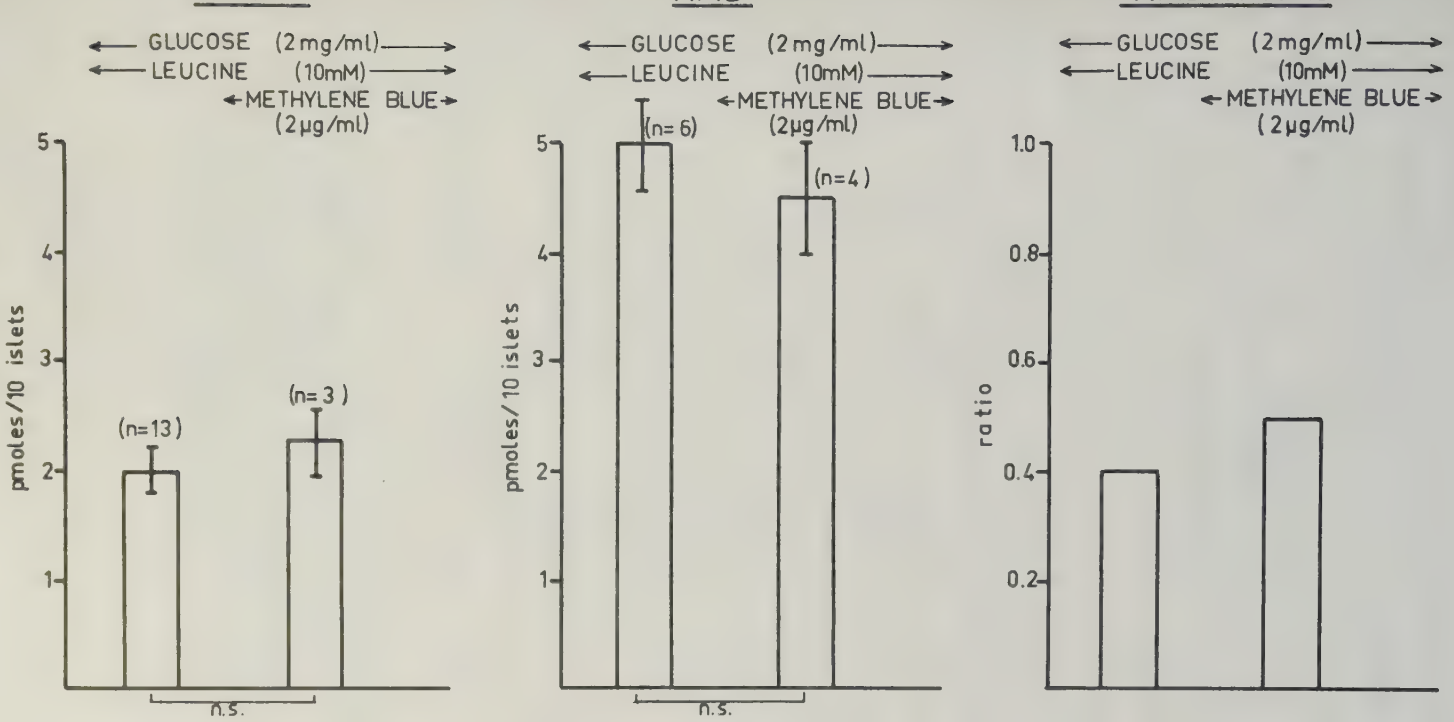


Abb. 7 : Einfluß von Methylenblau auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln der Ratte an NADH und NAD sowie deren NADH/NAD-Quotienten in Gegenwart von Leucin + Glucose.
Je 10 Inseln wurden in 2 ml Medium 90 min inkubiert. Mittelwerte ± SEM; n=Anzahl d. Versuche

3.1.3 Einfluß der Inkubationsdauer auf den Gehalt an NADPH und NADH sowie auf die Insulinsekretion

Nachdem einerseits aus den Versuchen von Ammon und Verspohl (30) bekannt war, daß exogenes Insulin in vitro die Freisetzung von Insulin hemmt, andrerseits, bei der von uns angewandten in vitro Technik, es während langandauernder Inkubation zur Ansammlung von freigesetztem Insulin im Medium kommt, sollte in der folgenden Versuchsreihe geklärt werden, welchen Einfluß die Inkubationsdauer auf die Wirkung von Leucin + Glucose hinsichtlich ihrer Beeinflussung des insulären Gehaltes an NADPH und NADH hat, da möglicherweise wegen der Akkumulation von Insulin die durch Glucose + Leucin bewirkte Erhöhung des NADPH-Gehaltes gehemmt werden könnte, wie es (30) bei Inkubation mit Glucose allein durch Zusatz von exogenem Insulin geschieht.

Abb. 8 zeigt, daß in Gegenwart von Leucin (10 mM) + Glucose (2mg/ml) der Gehalt an NADPH nach 15 min langer Inkubation signifikant höher liegt als bei 90 min langer Inkubation von je 5 Inseln in 1 ml Medium (Absinken von 1,45 auf 1,15 pmol/10 Inseln).

Der insuläre Gehalt an NADH wurde in Gegenwart von Leucin (10 mM) + Glucose (2mg/ml) durch die Dauer der Inkubation nicht beeinflußt (Abb. 9).

Abb. 10 zeigt die freigesetzte Menge Insulin nach 15 bzw. 90 min langer Inkubation mit Leucin (10 mM) + Glucose (2mg/ml). Sie betrug 210 µE IRI/ml nach 15 min und stieg nach 90 min signifikant auf 900 µE/ml an.

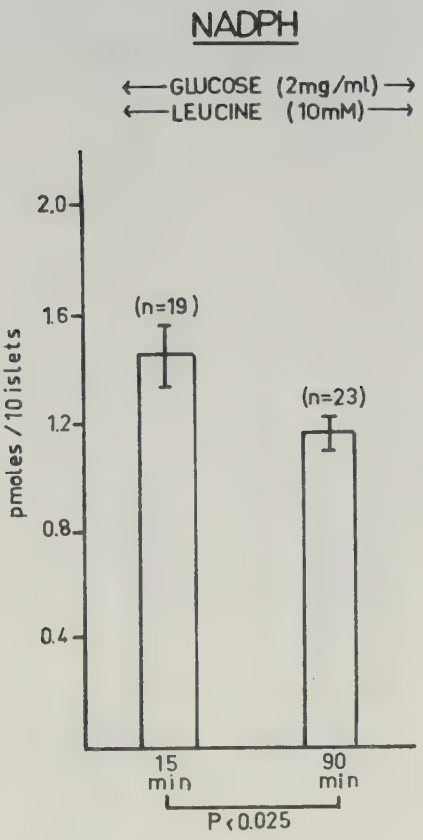


Abb. 8 : Einfluß der Inkubationsdauer auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln der Ratte an NADPH in Gegenwart von Leucin + Glucose. Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 15 bzw. 90 min lang inkubiert. Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche

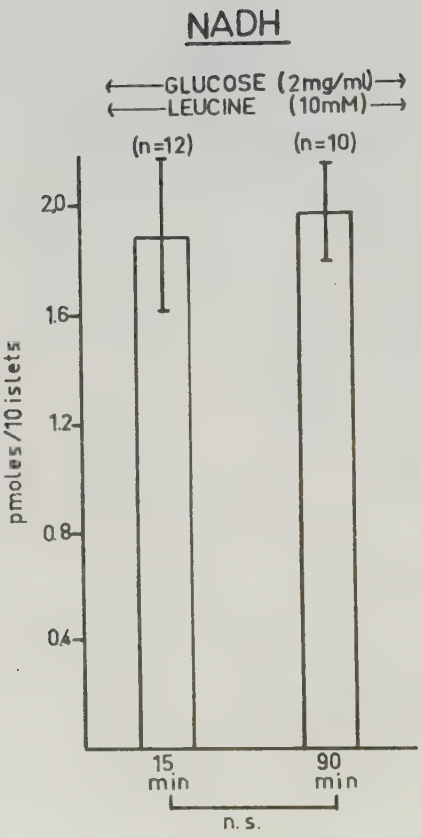


Abb. 9 : Einfluß der Inkubationsdauer auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln der Ratte an NADH in Gegenwart von Leucin + Glucose.
Je 10 Inseln wurden in 2 ml Medium 15 bzw. 90 min lang inkubiert. Mittelwerte ± SEM;
n = Anzahl der Versuche

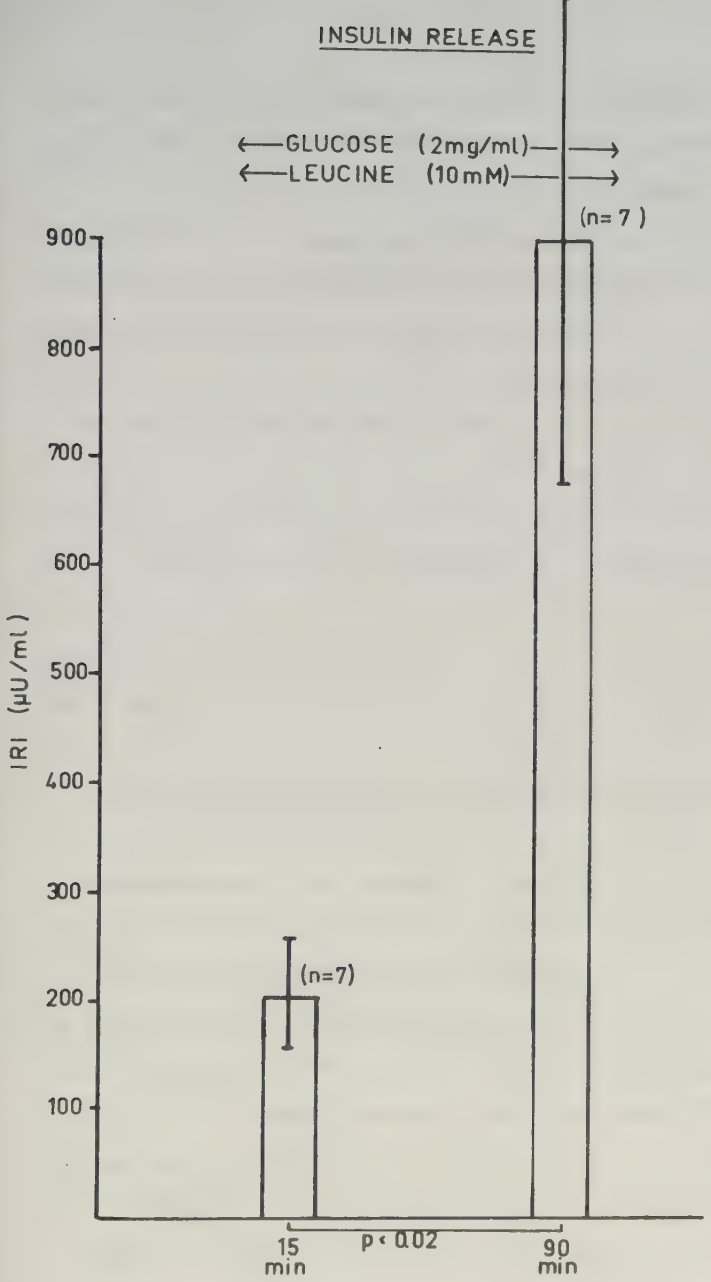


Abb. 10 : Einfluß der Inkubationsdauer auf die Sekretion von Insulin aus isolierten Pankreasinseln der Ratte in Gegenwart von Leucin + Glucose.
Je 10 Inseln wurden in 2 ml Medium 15 bzw. 90 min inkubiert. Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche

3.1.4 Einfluß verschiedener Leucin- und Glucosekonzentrationen auf den NADPH-Gehalt und die Insulinsekretion

In diesem Abschnitt der Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit der Einfluß von Leucin auf den insulären NADPH-Gehalt sowie auf die Insulinsekretion von der Dosierung dieser Aminosäure abhängt.
Außerdem sollte geprüft werden, bei welcher Glucosekonzentration Leucin am effektivsten ist.

Abb. 11 zeigt den Einfluß verschiedener Leucinkonzentrationen im Inkubationsmedium (10, 20 und 40 mM) in Gegenwart von Glucose (1 mg/ml) auf den NADPH-Gehalt nach 30 minütiger Inkubation von je 10 Inseln in 2 ml Medium. Es ist deutlich erkennbar, daß eine maximale Steigerung des NADPH-Gehaltes mit der niedrigsten eingesetzten Leucinkonzentration (10 mM) erzielt wurde (signifikanter Anstieg von 0,82 pmol/ 10 Inseln in Gegenwart von Glucose allein auf 1,27 pmol/10 Inseln bei Leucinzusatz). Mit steigender Leucinkonzentration nimmt der NADPH-Gehalt ab. Bei 40 millimolarer Leucinkonzentration im Medium zeigt sich bereits keine signifikante Steigerung des NADPH-Gehaltes mehr durch die Leucinzugabe gegenüber dem Gehalt bei Anwesenheit von Glucose allein.

In Gegenwart einer Glucosekonzentration von 2 mg/ml ist der NADPH-Gehalt bereits höher als bei Anwesenheit von 1 mg Glucose/ml (stat. nicht signifikanter Anstieg von 0,82 auf 0,91 pmol/10 Inseln). Hier führt Leucin in 10 millimolarer Konzentration zu einer Steigerung des NADPH-Gehaltes von 0,91 auf 1,24 pmol/10 Inseln (Abb. 12).

Der Anstieg ist jedoch geringer als bei Anwesenheit von 1 mg Glucose/ml und nicht mehr statistisch signifikant. Leucin ist also unter den gegebenen Bedingungen in Gegenwart substimulatorischer Glucosemengen hinsichtlich der Erhöhung des insulären NADPH-Gehaltes effektiver als zusammen mit höheren Glucosekonzentrationen.

Betrachtet man nun unter denselben Bedingungen die Insulinsekretion, so erkennt man aus Abb. 13, daß in Gegenwart von Glucose bei einer Konzentration von 1 mg/ml Leucin (10 mM) die Insulinsekretion von 80 µE/ml signifikant auf 166 µE/ml erhöht, eine 20 millimolare Leucinkonzentration bewirkt einen weiteren Anstieg auf 234 µE/ml. Mit Leucin in 40 millimolarer Konzentration ist demgegenüber keine weitere Erhöhung der Insulinsekretion zu erzielen.

Glucose in einer Konzentration von 2 mg/ml führt zu einem statistisch signifikanten Anstieg der Insulinsekretion von 80 µE/ml bei 1 mg Glucose/ml auf 176 µE/ml. Leucin (10 mM) bewirkt eine stat. nicht signifikante Erhöhung der Insulinfreisetzung in Gegenwart von 2 mg Glucose/ml auf 251 µE IRI/ml, Leucin (20 mM) steigert die Sekretion signifikant auf 401 µE IRI/ml Medium. Eine weitere Erhöhung der Leucinkonzentration auf 40 mmol/l hat keinen Effekt mehr auf die Insulinsekretion. (Abb. 13).

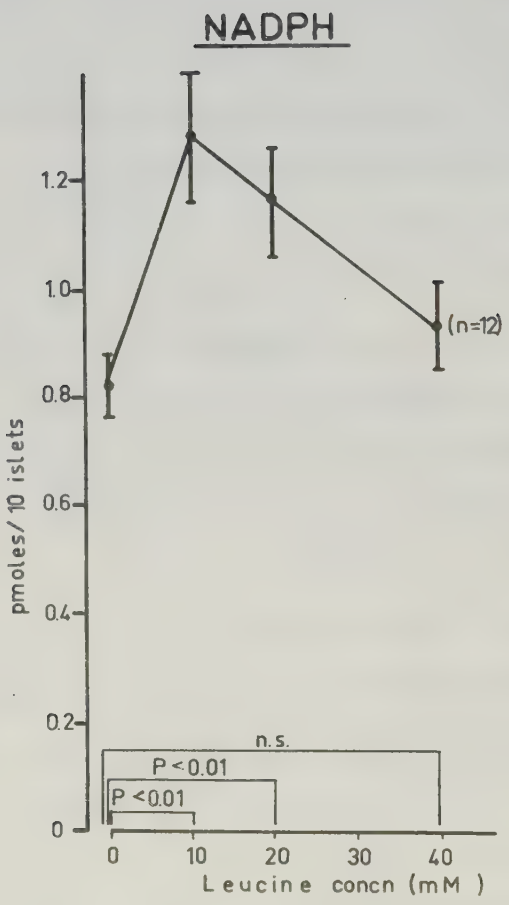


Abb. 11 : Einfluß verschiedener Leucinkonzentrationen auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln der Ratte an NADPH in Gegenwart von 1 mg Glucose pro ml Medium.
Je 10 Inseln wurden in 2 ml Medium 30 min lang inkubiert. Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche

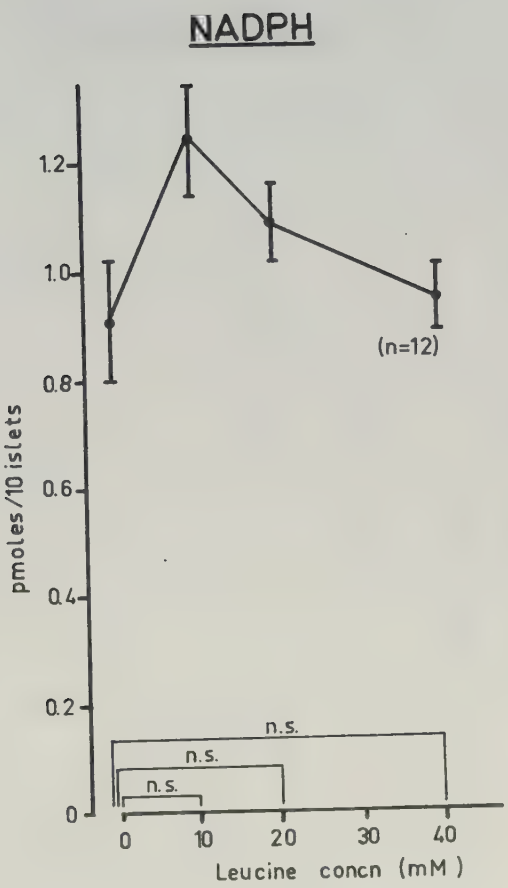


Abb. 12 : Einfluß verschiedener Leucinkonzentrationen auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln der Ratte an NADPH in Gegenwart von 2 mg Glucose pro ml Medium.
Je 10 Inseln wurden in 2 ml Medium 30 min lang inkubiert. Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche

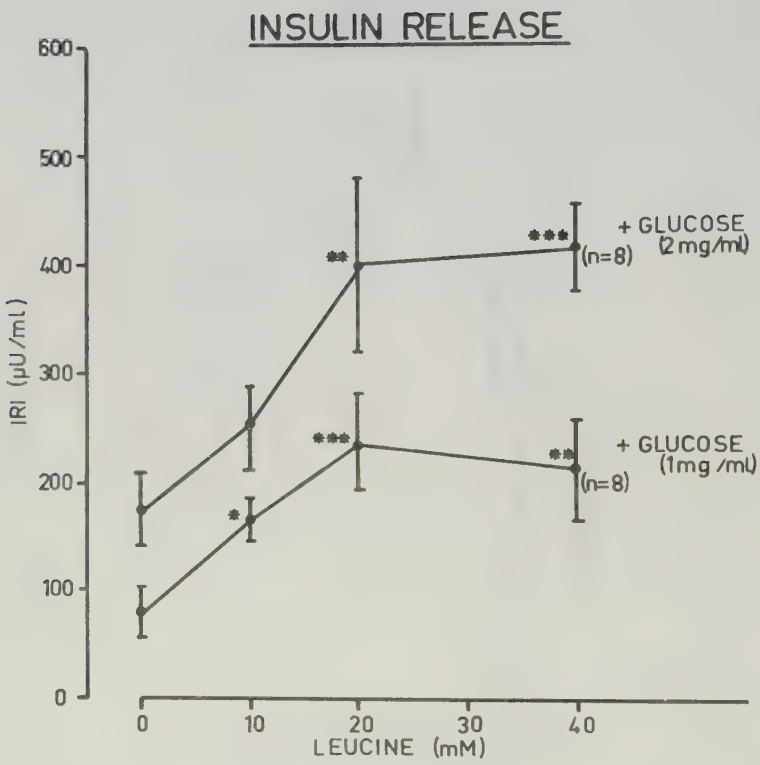


Abb. 13 : Einfluß verschiedener Leucinkonzentrationen auf die Sekretion von Insulin aus isolierten Pankreasinseln der Ratte in Gegenwart von 1 mg bzw. 2 mg Glucose pro ml Medium. Je 10 Inseln wurden in 2 ml Medium 30 min lang inkubiert. Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche; * = P 0,05; ** = P 0,02; *** = P 0,01

3.1.5 Einfluß von Leucin und Glucose auf den 6-Phosphogluconat- und den Glucose-6-phosphat-Gehalt

Um in der Frage, wodurch die Erhöhung des NADPH/NADP-Quotienten bei Leucingaben zu isolierten Pankreasinseln erzielt wird, einer Antwort näher zu kommen, wurde im nächsten Abschnitt dieser Arbeit als Maß für die Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase der 6-PG/G-6-P-Quotient bestimmt. Akhtar (44) hat gezeigt, daß nach 15 minütiger Inkubation von je 5 isolierten Pankreasinseln in 1 ml Medium die Glucose (1-5 mg/ml) dosisabhängig sowohl den Gehalt an G-6-P als auch den 6-PG Gehalt erhöht. In der vorliegenden Arbeit wurden die Versuchsbedingungen gewählt, unter denen Leucinzusatz eine optimale NADPH-Steigerung bewirkt hatte. Zur Kontrolle wurde überprüft, ob unter diesen Bedingungen die Glucose allein ebenfalls zu einem Anstieg des 6-PG/G-6-P-Quotienten führt.

Je 10 Inseln wurden in 2 ml Medium, das 1 mg, 2 mg und 3 mg Glucose/ml enthielt, 30 min lang inkubiert. Wie Abb. 14 zeigt, steigt der 6-PG-Gehalt von 0,74 pmol/10 Inseln bei Anwesenheit von 1 mg Glucose/ml Medium statistisch signifikant an auf 1,23 pmol/10 Inseln bei einer Glucosekonzentration von 2 mg/ml. Eine Erhöhung der Glucosekonzentration auf 3 mg/ml bewirkte einen weiteren Anstieg auf 1,92 pmol/10 Inseln.
Auch der G-6-P-Gehalt wurde durch Glucose signifikant dosisabhängig erhöht, von 1,38 pmol/10 Inseln bei einer Glucosekonzentration von 1 mg/ml auf 1,91 pmol/10 Inseln mit 2 mg/ml und auf 2,57 pmol/10 Inseln bei einer Konzentration der Glucose von 3 mg/ml Medium. Da die durch Glucose bewirkte Steigerungsrate des G-6-P-Gehaltes nur

die Hälfte der 6-PG-Steigerungsrate ausmachte, ergab sich eine Erhöhung des 6-PG/G-6-P-Quotienten von 0,54 auf 0,64 auf 0,75.

Da sich in den vorhergehenden Versuchen eine 10 millimolare Leucinkonzentration in Kombination mit einer substimulatorischen Glucosekonzentration von 1 mg/ml bei 30 minütiger Inkubation von je 10 Inseln in 2 ml als die effektivste inbezug auf die NADPH-Erhöhung gezeigt hatte, wurde nun unter diesen Bedingungen der Gehalt an 6-PG und G-6-P gemessen.

Wie Abb. 15 zeigt, führt Leucin (10 mM) in Gegenwart von 1 mg Glucose/ml Medium zu einer ganz geringen nicht signifikanten Steigerung des 6-Phosphogluconat-Gehaltes von 0,74 pmol/10 Inseln mit Glucose (1 mg/ml) allein auf 0,97 pmol/10 Inseln. Der G-6-P-Gehalt bleibt nahezu unverändert bei Leucinzusatz. Somit ergibt sich rechnerisch eine Steigerung des 6-PG/G-6-P-Quotienten von 0,54 mit Glucose (1 mg/ml) allein auf 0,75 bei Zusatz von Leucin.

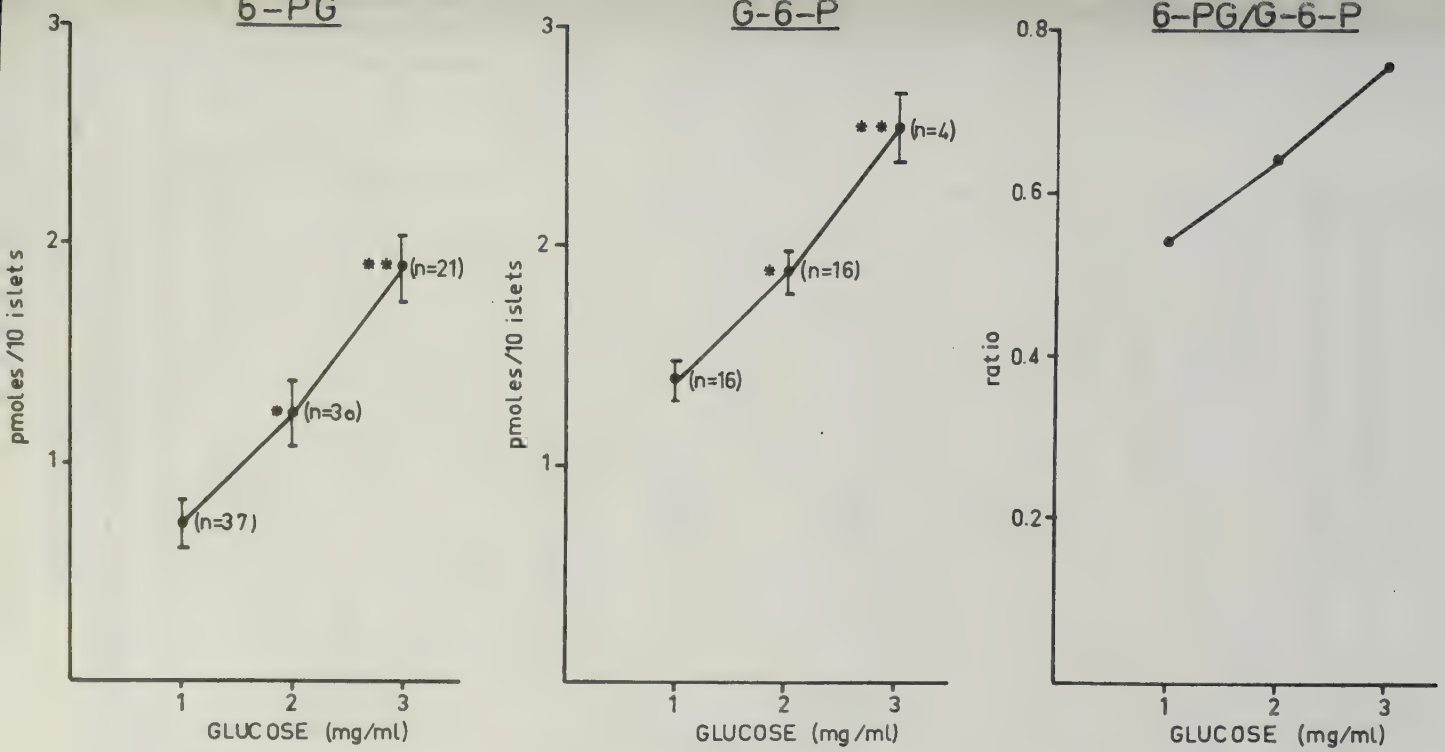


Abb. 14 : Einfluß von Glucose auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln der Ratte an 6-Phosphogluconat und Glucose-6-phosphat sowie deren 6-PG/G-6-P-Quotienten.
Je 10 Inseln wurden in 2 ml Medium 30 min lang inkubiert. Mittelwerte + SEM; n = Anzahl der Versuche

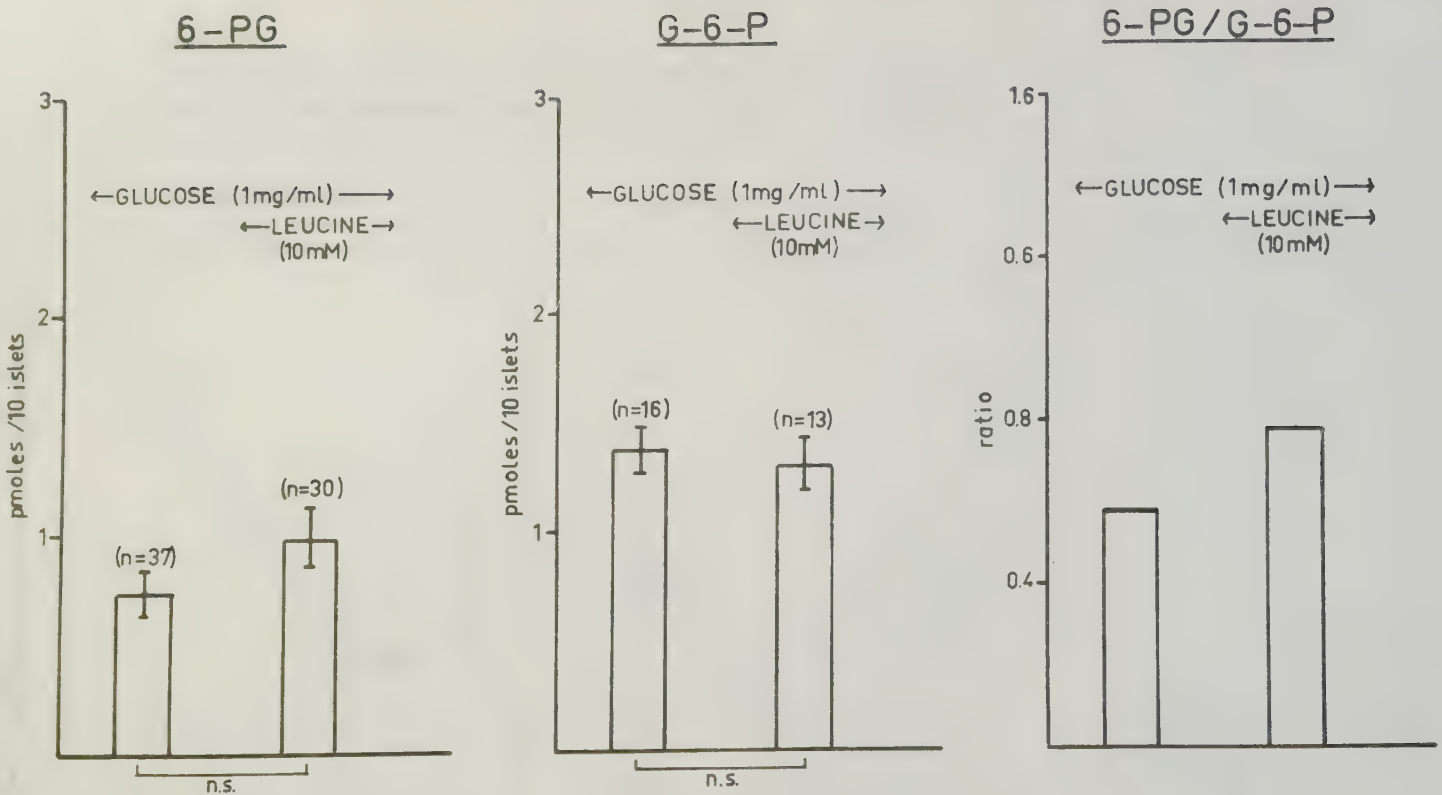


Abb. 15 : Einfluß von Leucin auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln der Ratte an 6-Phosphogluconat und Glucose-6-phosphat sowie deren 6-PG/G-6-P-Quotienten in Gegenwart von Glucose. Je 10 Inseln wurden in 2 ml Medium 30 min lang inkubiert. Mittelwerte + SEM; n=Anzahl

3.2 Arginin

3.2.1 Einfluß von Arginin auf den Gehalt an NADPH und NADP sowie auf die Insulinsekretion

Untersuchungen über den Einfluß von Arginin auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln der Ratte an NADPH und NADP ergaben, wie Abb. 16 zeigt, daß Arginin (10 mM) in Gegenwart von Glucose (2 mg/ml) nach 60 minütiger Inkubation von je 10 Inseln in 0,7 ml Medium nur zu einer geringen statistisch nicht signifikanten Steigerung des Gehaltes an NADPH von 1,17 (Glucose allein) auf 1,36 pmol/10 Inseln führt. Der NADP-Gehalt ändert sich nicht, der NADPH/NADP-Quotient steigt von 0,84 auf 1,03 bei Zugabe von Arginin. Dieser Anstieg ist geringer als bei Gegenwart von Leucin (10 mM) (Erhöhung von 0,84 auf 1,28, vgl. Abb. 1).

Aus Abb. 17 läßt sich ersehen, daß Arginin unter gegebenen Bedingungen zu einer signifikanten Steigerung der glucoseinduzierten Insulinsekretion führt und zwar ist ein Anstieg an freigesetztem Insulin von 590 µE/ml (bei Glucose allein) auf 941 µE/ml nach Argininzusatz festzustellen.

Der Einfluß von Methylenblau (2 µg/ml auf den Gehalt an NADPH und NADP in isolierten Pankreasinseln in Gegenwart von Arginin (10 mM) + Glucose (2 mg/ml) ist in Abb. 18 dargestellt. Hier läßt sich eine signifikante Erniedrigung des NADPH-Gehaltes von 1,36 auf 0,76 pmol/10 Inseln erkennen, während das NADP signifikant von 1,32 auf 2,07 pmol/10 Inseln erhöht wurde. Der NADPH/NADP-Quotient ist also durch Methylenblauzusatz von 1,03 auf 2,07 pmol/10 Inseln herabgesetzt. Mit der Abnahme des Quotienten ging eine Hemmung der Insulinsekretion (Abb. 19) durch Methylenblau einher und zwar von 941 auf 531 µE IRI/ml.

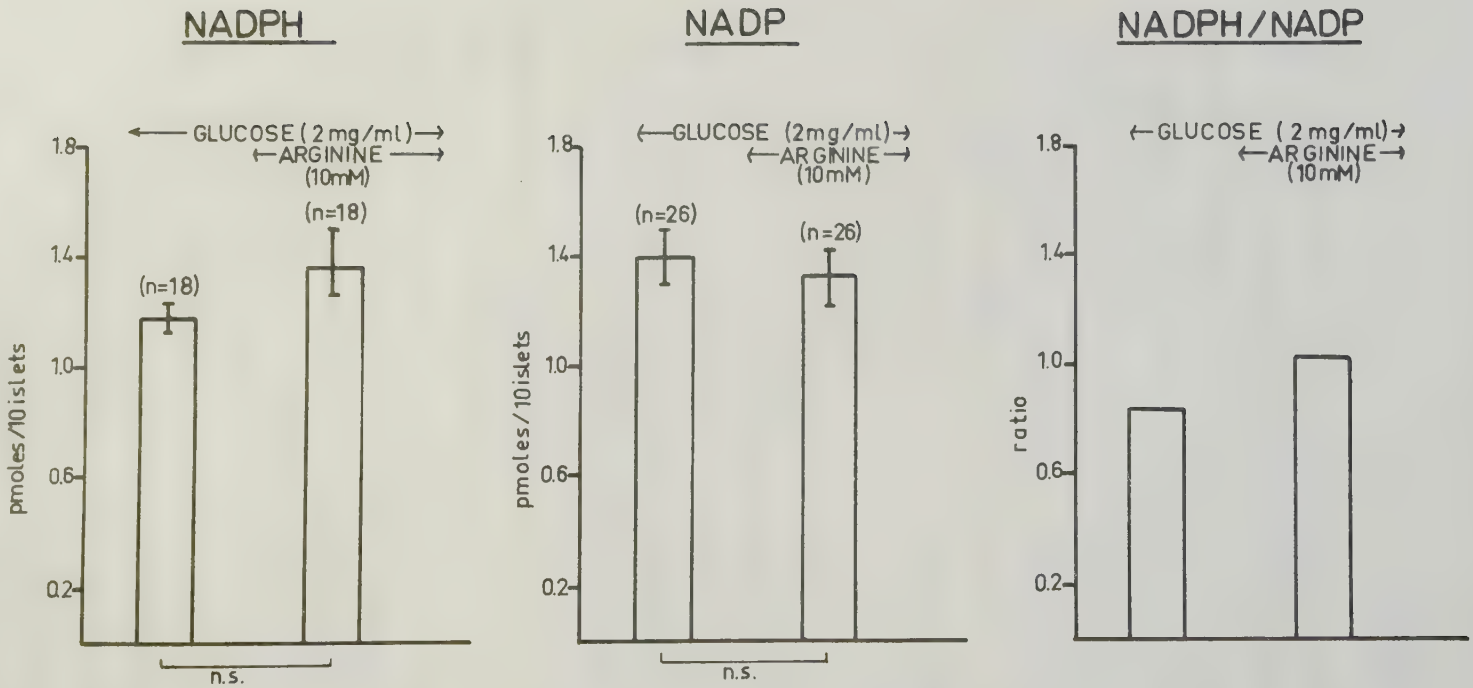


Abb. 16 : Einfluß von Arginin auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln der Ratte an NADPH und NADP sowie deren NADPH/NADP-Quotienten in Gegenwart von Glucose.
Je 10 Inseln wurden 60 min lang in 0,7 ml Medium inkubiert. Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche

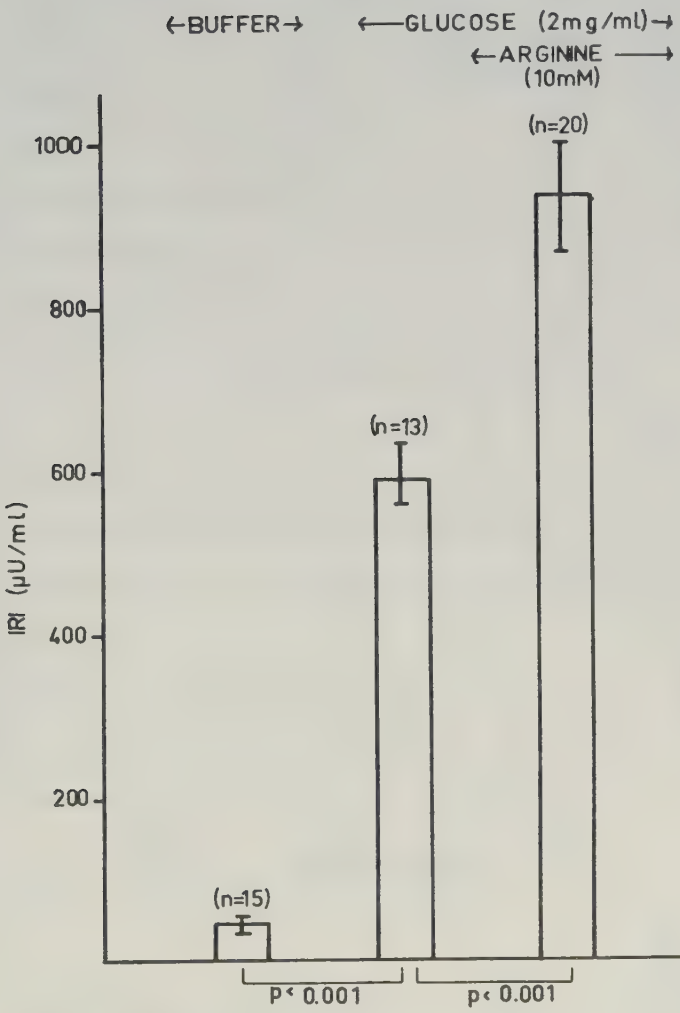


Abb. 17 : Einfluß von Arginin und Glucose auf die Sekretion von Insulin aus isolierten Pankreasinseln der Ratte.
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 90 min lang inkubiert. Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche

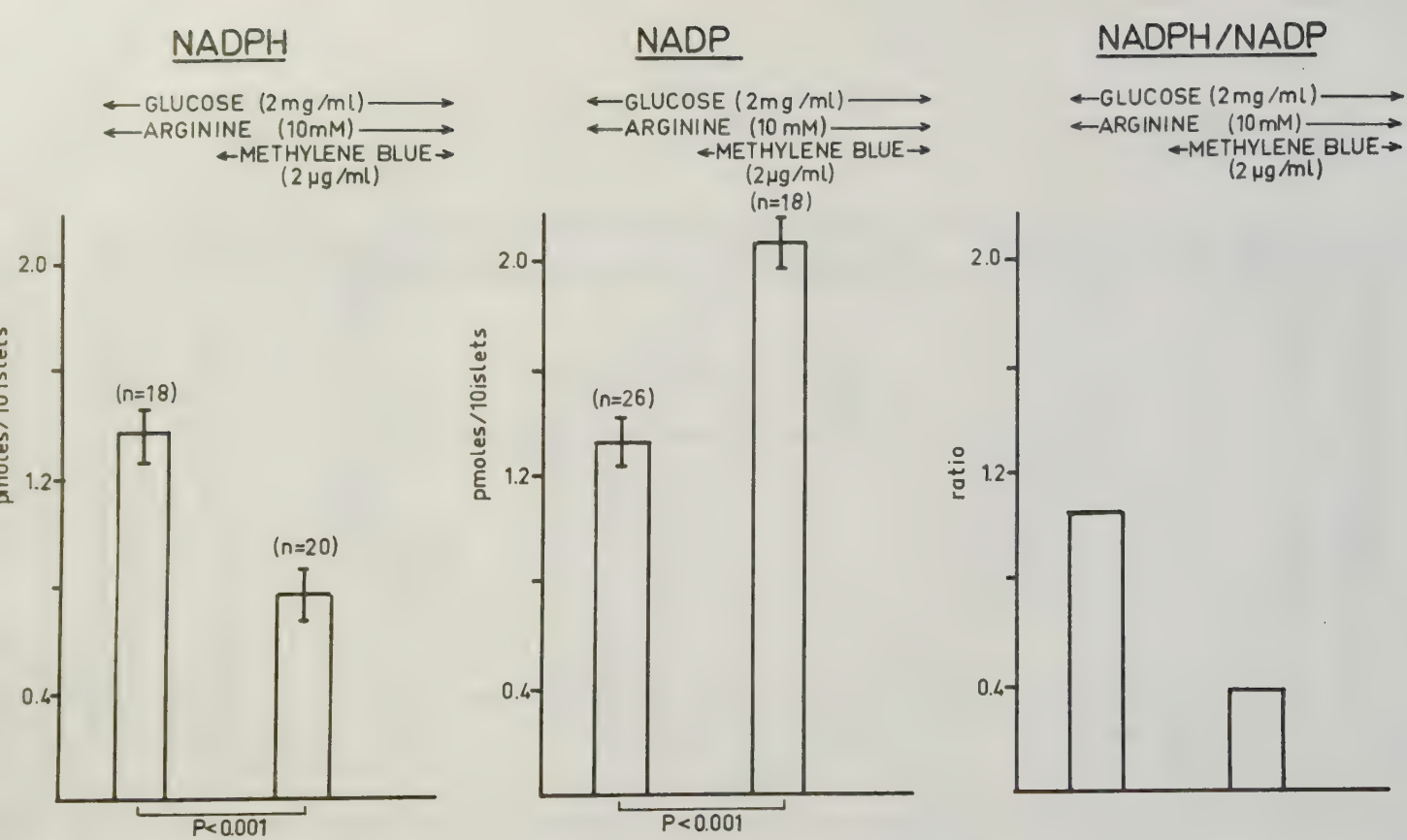


Abb. 18 : Einfluß von Methylenblau auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln der Ratte an NADPH und NADP sowie deren NADPH/NADP-Quotienten in Gegenwart von Arginin + Glucose.
Je 10 Inseln wurden in 0,7 ml 60 min inkubiert. Mittelwerte ± SEM; n=Anzahl der Versuche

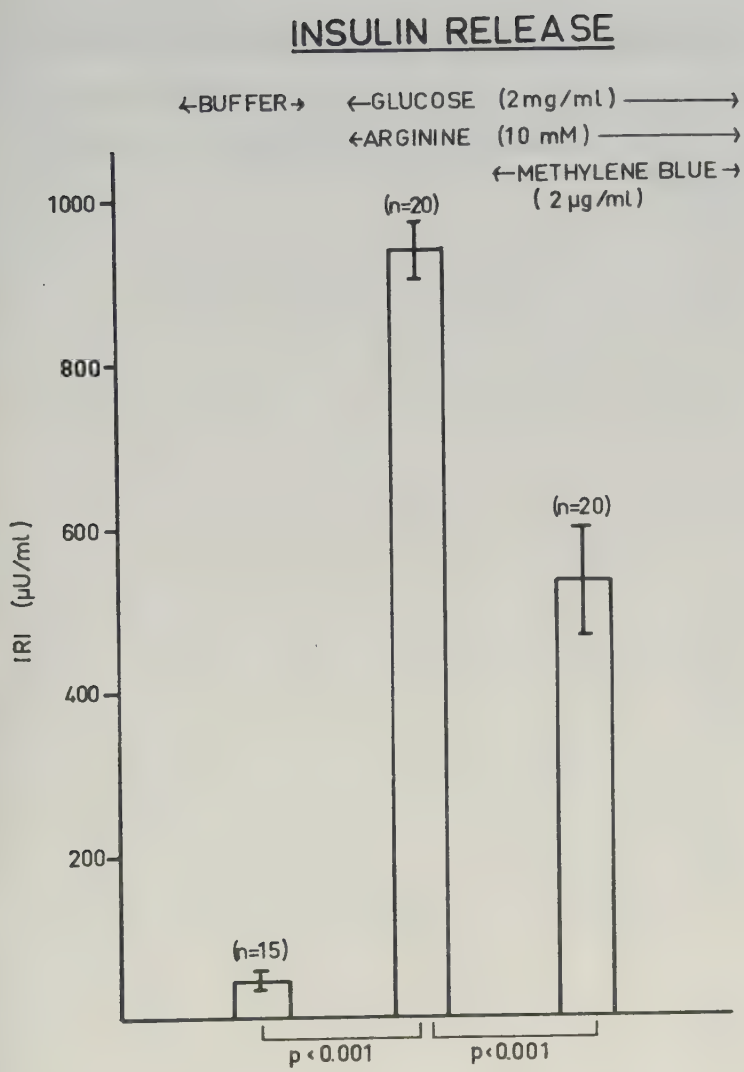


Abb. 19 : Einfluß von Methylenblau auf die Sekretion von Insulin aus isolierten Pankreasinseln der Ratte in Gegenwart von Arginin + Glucose.
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 90 min lang inkubiert. Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche

3.2.2 Einfluß von Arginin auf den Gehalt an NADH und NAD

In dieser Versuchsreihe sollte überprüft werden, ob Arginin auch auf den insulären Gehalt an NADH und NAD einen Einfluß ausübt.

Je 10 Inseln wurden in 2 ml Medium, das Arginin (10 mM) + Glucose (2 mg/ml) enthielt, 15 min lang inkubiert. Arginin hatte unter diesen Bedingungen, wie Abb. 20 erkennen läßt, keinen meßbaren Einfluß auf den Gehalt an NADH und NAD in den Pankreasinseln.

Aus Abb. 21 ist ersichtlich, daß auch der Zusatz von Methylenblau (2 µg/ml) in Gegenwart von Arginin (10 mM) + Glucose (2 mg/ml) nicht den NADH- und NAD-Gehalt veränderte.

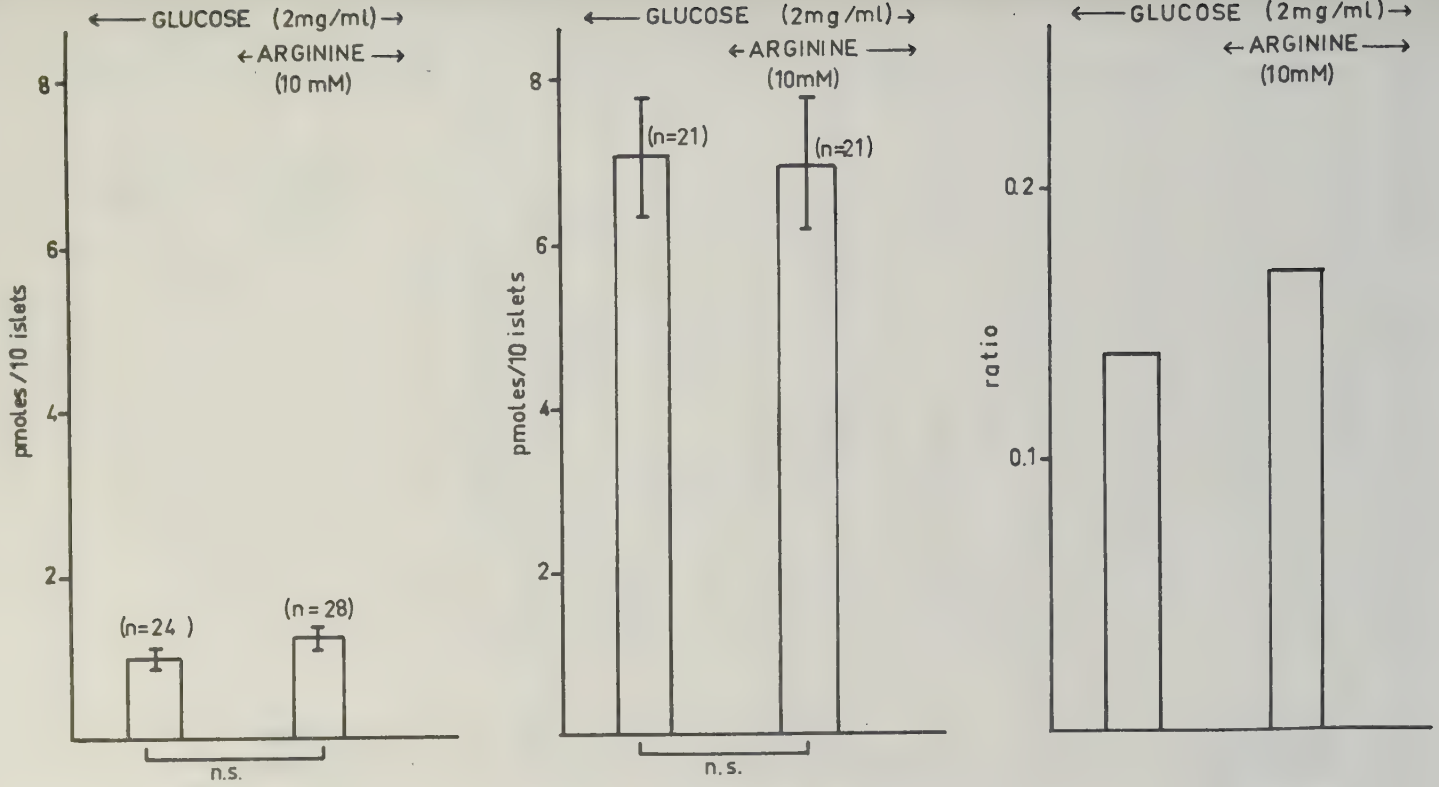


Abb. 20 : Einfluß von Arginin auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln der Ratte an NADH und NAD sowie deren NADH/NAD-Quotienten in Gegenwart von Glucose.
Je 10 Inseln wurden in 2 ml 15 min inkubiert. Mittelwerte ± SEM; n= Anzahl der Versuche

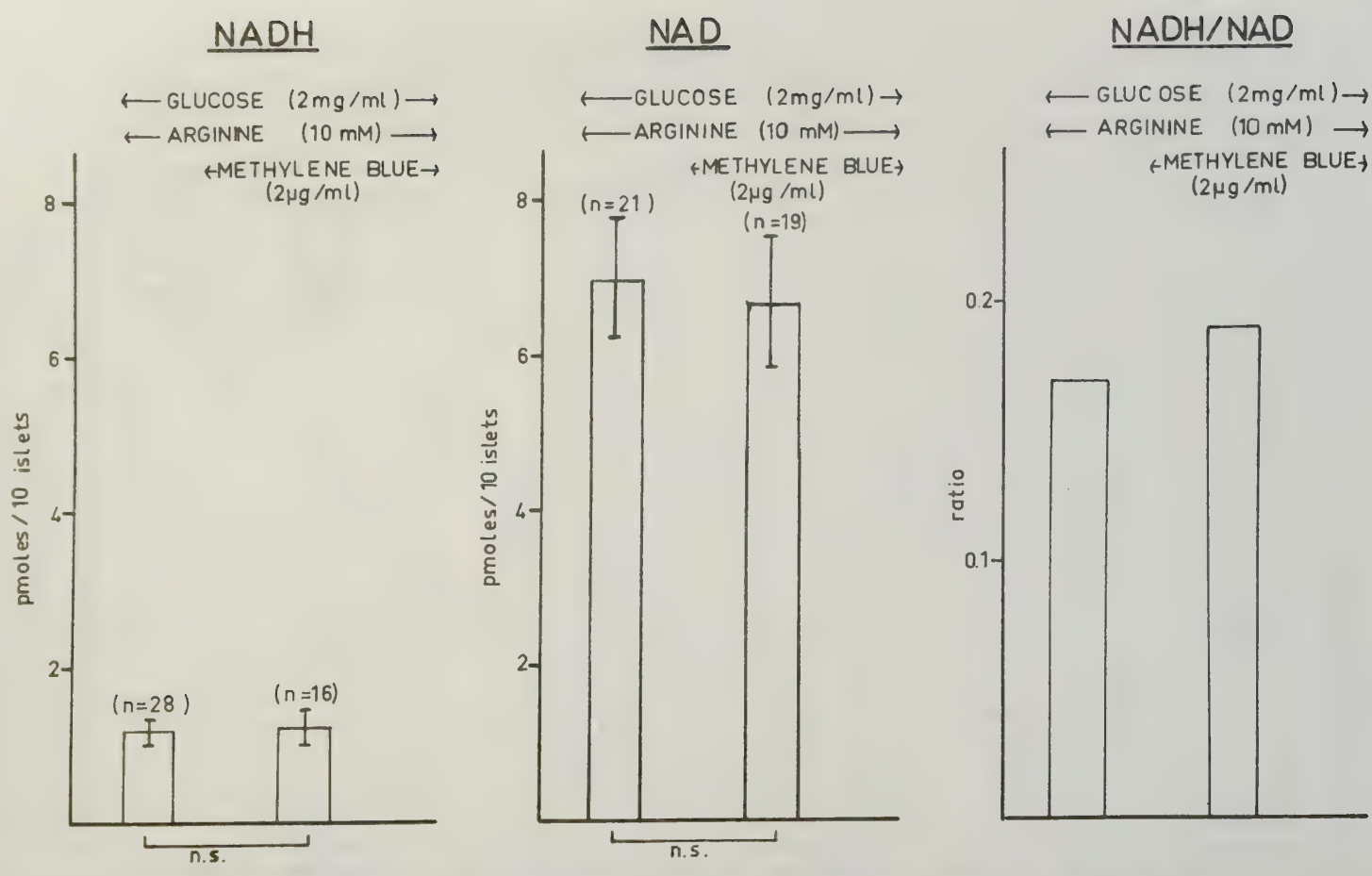


Abb. 21 : Einfluß von Methylenblau auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln an NADH und NAD sowie deren NADH/NAD-Quotienten in Gegenwart von Arginin + Glucose

3.2.3 Einfluß der Inkubationsdauer auf den NADPH- und NADH-Gehalt sowie auf die Insulinsekretion

Aus den unter 3.1.3 erwähnten Gründen wurde der Einfluß der Inkubationsdauer auf die Wirkung von Arginin + Glucose hinsichtlich einer Veränderung des Gehaltes an NADPH und NADH sowie der Insulinsekretion untersucht.

Analog den Inkubationsbedingungen für Leucin wurde Arginin (10 mM) zusammen mit Glucose (2 mg/ml) dem Medium zugesetzt und je 5 Inseln in 1 ml Medium 15 bzw. 90 min lang inkubiert.

Wie die Abb. 22 zeigt, sinkt der NADPH-Gehalt in Gegenwart von Arginin + Glucose von 1,55 pmol/10 Inseln bei 15 minütiger Inkubation nach 90 min signifikant auf 1,13 pmol/10 Inseln herab.

Der insuläre Gehalt an NADH wurde in Gegenwart von Arginin (10 mM) + Glucose (2 mg/ml) durch die Dauer der Inkubation nicht beeinflußt. (Abb. 23)

Hinsichtlich der Insulinsekretion fanden sich beim Arginin ähnliche Verhältnisse wie beim Leucin. In Gegenwart von Arginin (10 mM) + Glucose (2 mg/ml) war die freigestzte Menge Insulin nach 90 min signifikant höher als nach 15 min (Anstieg von 241 auf 901 μE IRI/ml)(Abb. 24).

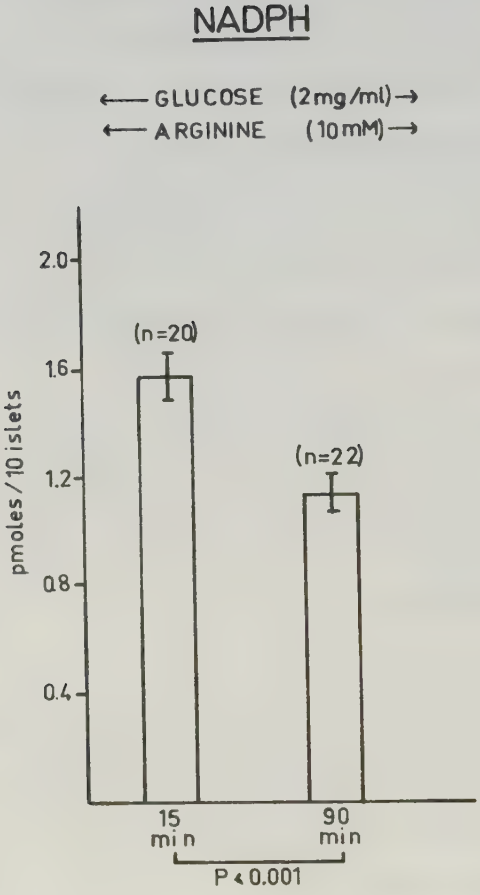


Abb. 22: Einfluß der Inkubationsdauer auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln der Ratte an NADPH in Gegenwart von Arginin + Glucose.
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 15 bzw. 90 min lang inkubiert. Mittelwerte ± SEM;
n = Anzahl der Versuche

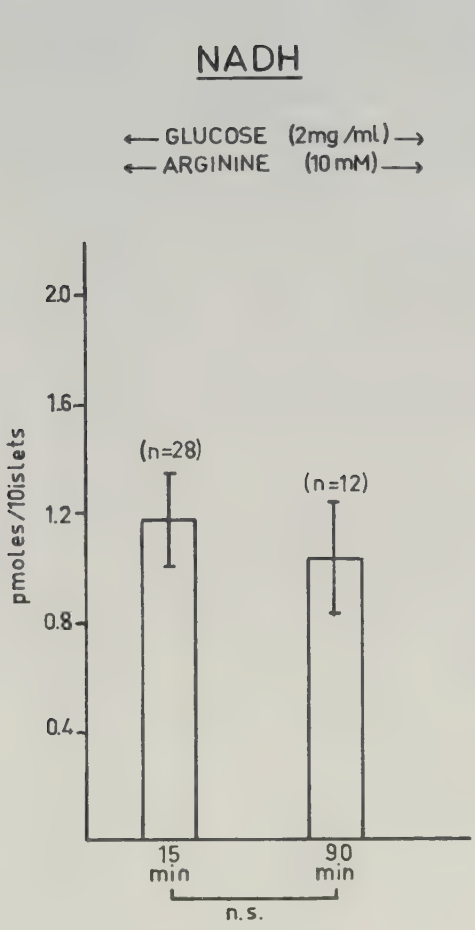


Abb. 23 : Einfluß der Inkubationsdauer auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln der Ratte an NADH in Gegenwart von Arginin + Glucose.
Je 10 Inseln wurden in 2 ml Medium 15 bzw. 90 min lang inkubiert. Mittelwerte ± SEM;
n = Anzahl der Versuche

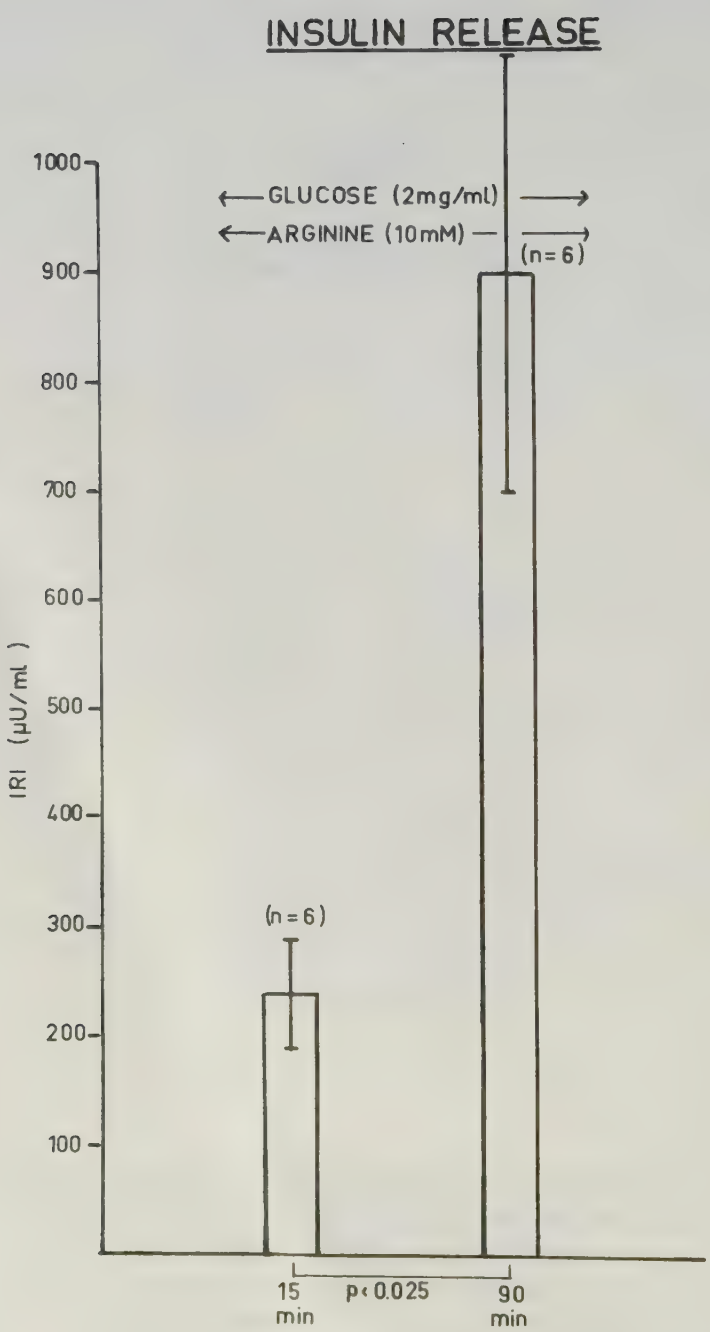


Abb. 24 : Einfluß der Inkubationsdauer auf die Sekretion von Insulin aus isolierten Pankreasinseln der Ratte in Gegenwart von Arginin + Glucose. Je 10 Inseln wurden in 2 ml 15 bzw. 90 min lang inkubiert. Mittelwerte ± SEM; n=Anzahl d. Versuche

3.2.4 Einfluß verschiedener Arginin- und Glucosekonzentrationen auf den Gehalt an NADPH und die Insulinsekretion

Um zum einen festzustellen, inwieweit der Einfluß von Arginin auf den insulären Gehalt an NADPH und die Insulinsekretion von seiner Dosierung abhängt, und zum anderen zu untersuchen, bei welcher Glucosekonzentration Arginin am effektivsten ist, wurden in dieser Versuchsserie verschiedene Argininkonzentrationen (10, 20 und 40 mM) und Glucose in Konzentrationen von 1 mg/ml bzw. 2 mg/ml miteinander kombiniert.

Nach 3o minütiger Inkubation von je 10 Inseln in 2 ml Medium, das Arginin (10, 20 und 40 mM) und Glucose in einer Konzentration von 1 mg/ml enthielt, zeigte deutliche Steigerung des NADPH-Gehaltes (Abb. 25).

Bei einer Glucosekonzentration von 2 mg/ml (Abb. 26) führt eine 10 millimolare Argininkonzentration zu einem geringfügigen statistisch nicht signifikanten Anstieg des insulären NADPH-Gehaltes von 1,25 auf 1,39 pmol/10 Inseln. Mit zunehmendem Argiringehalt im Medium sinkt jedoch der NADPH-Gehalt. Eine 20 millimolare Argininkonzentration zusammen mit 2 mg Glucose/ml bewirkt bereits eine geringe statistisch nicht signifikante Erniedrigung des NADPH-Gehaltes, der nach Inkubation mit 2 mg Glucose/ml allein in der Insel zu messen war, Absinken von 1,25 (ohne Arginin) auf 1,18 pmol/10 Inseln (20 mM Arginin). Arginin in 40 millimolarer Konzentration bewirkt eine weitere Erniedrigung auf 1,05 pmol NADPH/10 Inseln.

Abb. 27 macht den Einfluß der Glucosekonzentration auf die Wirkung verschiedener Arginindosen inbezug auf die Freisetzung von Insulin aus den isolierten Inseln erkennbar. Zusammen mit einer Glucosekonzentration von 1 mg/ml führen 10, 20 und 40 millimolare Argininkonzentrationen im Inkubationsmedium zu keiner signifikanten Steigerung der Insulinsekretion.

1 mg Glucose/ml Inkubationsmedium bewirkte unter den gegebenen Bedingungen allein noch keine Stimulierung der Insulinsekretion. Erst 2 mg/ml induzierten eine Insulinfreisetzung von 176 µE/ml, die in Gegenwart von Arginin (10 mM) auf 400 µE/ml erhöht wurde und mit 20 mmol Arginin/l noch weiter auf 501 µE IRI/ml gesteigert wurde. Bei Zugabe einer größeren Argininmenge, einer 40 millimolaren Konzentration im Medium, waren nach 30 minütiger Inkubation nur noch 415 µE/ml zu messen.

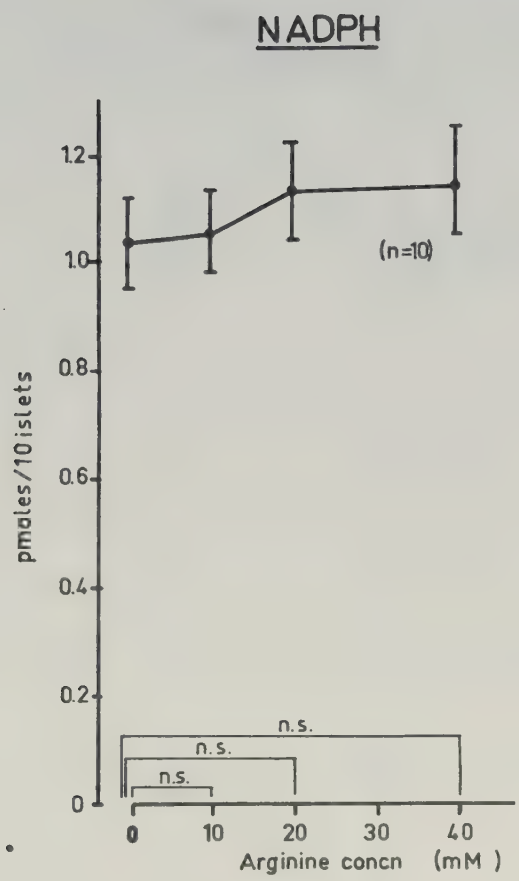


Abb. 25 : Einfluß verschiedener Argininkonzentrationen auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln der Ratte an NADPH in Gegenwart von 1 mg Glucose pro ml Medium.
Je 10 Inseln wurden in 2 ml Medium 30 min lang inkubiert. Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche

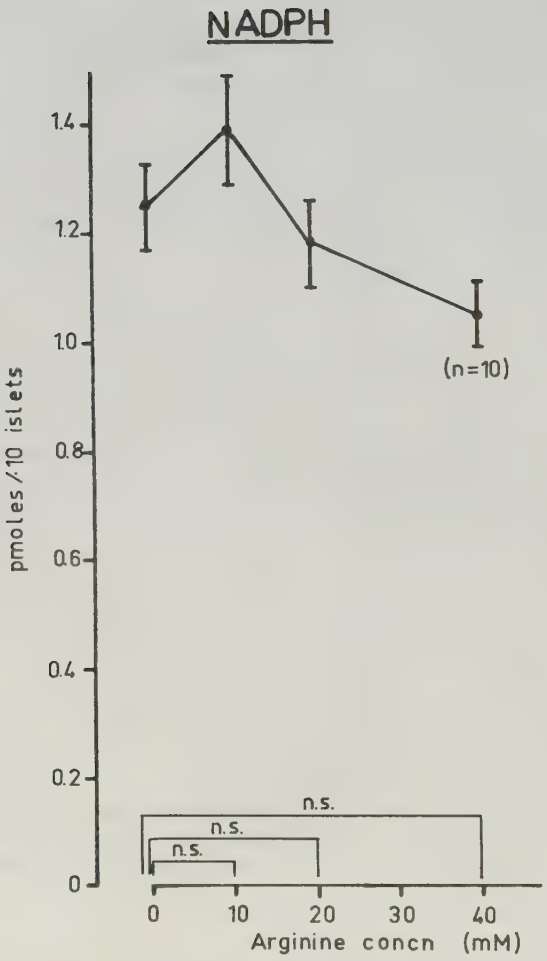


Abb. 26 : Einfluß verschiedener Argininkonzentrationen auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln der Ratte an NADPH in Gegenwart von 2 mg Glucose pro ml Medium.
Je 10 Inseln wurden in 2 ml Medium 30 min lang inkubiert. Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche

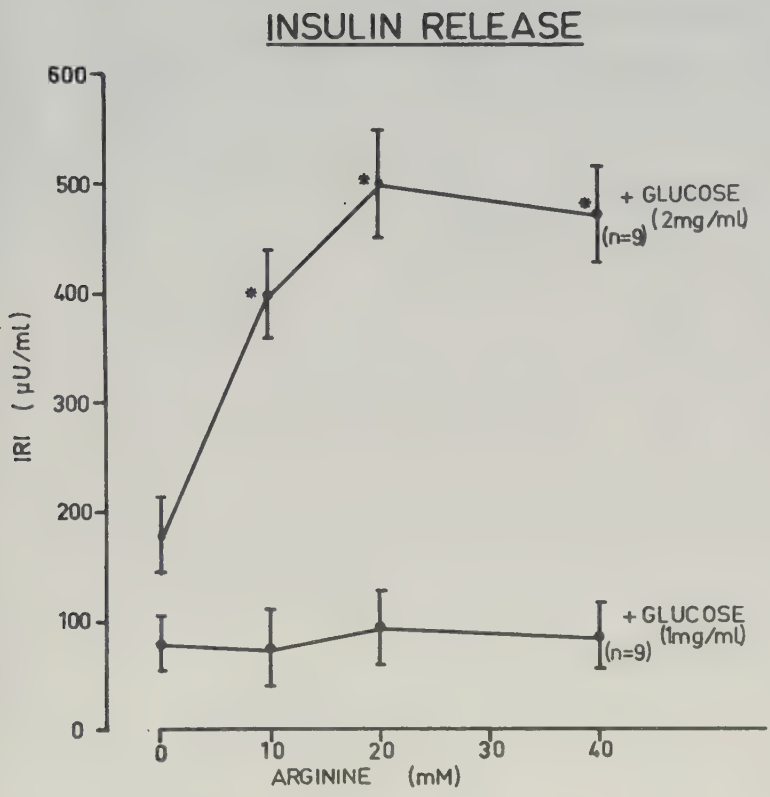


Abb. 27 : Einfluß von Arginin auf die Sekretion von Insulin aus isolierten Pankreasinseln der Ratte in Abhängigkeit sowohl von der Arginindosis als auch von der damit kombinierten Glucosemenge. Je 10 Inseln wurden in 2 ml Medium 30 min lang inkubiert. Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche

3.2.5 Einfluß von Arginin auf den Gehalt an 6-Phosphogluconat und Glucose-6-phosphat

Bei Untersuchungen mit Arginin hatte sich gezeigt, daß inbezug auf die Erhöhung des NADPH-Gehaltes von isolierten Pankreasinseln, auch wenn diese nicht statistisch signifikant war, eine Konzentration von 10 mmol Arginin/l kombiniert mit 2 mg Glucose pro ml Medium bei 30 minütiger Inkubationsdauer den deutlichsten Effekt erzielte. Diese Bedingungen wurden also für diese Versuchsreihe eingehalten, in der geklärt werden sollte, ob Arginin eine Veränderung des 6-PG/G-6-P-Verhältnisses bewirkt.

Die Abb. 28 zeigt, daß Arginin (10 mM) in Gegenwart von 2 mg Glucose/ml Medium weder zu einer Steigerung des 6-PG-Gehaltes noch zu einer Zunahme des G-6-P-Gehaltes führte.

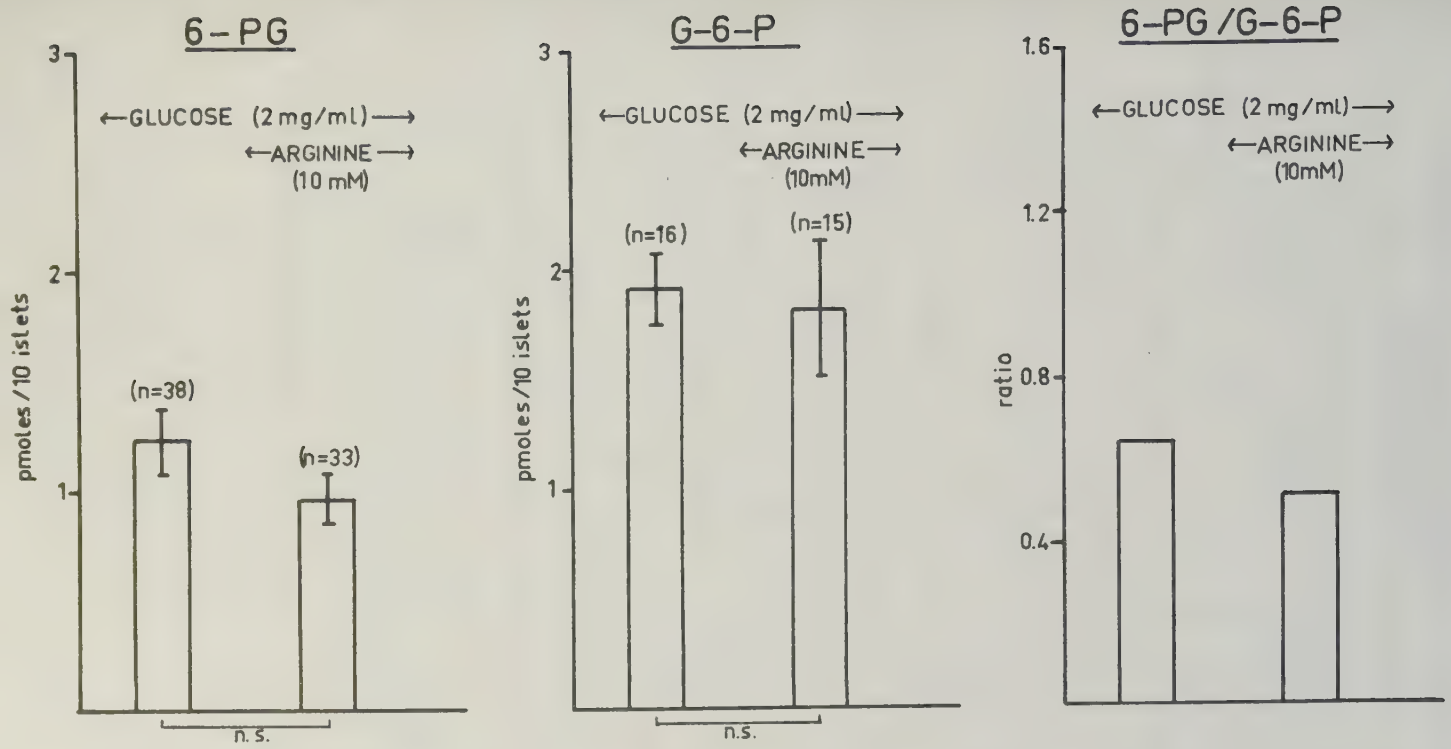


Abb. 28 : Einfluß von Arginin auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln der Ratte an 6-Phosphogluconat und Glucose-6-phosphat sowie deren 6-PG/G-6-P-Quotienten in Gegenwart von Glucose.
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 30 min inkubiert. Mittelwerte + SEM; n=Anzahl d. Versuche

3.3 Vergleich der Wirkungen von Leucin und Arginin

Vergleicht man nun die Aminosäuren Arginin und Leucin (jeweils 10 mM) hinsichtlich ihres Einflusses auf den NADPH/NADP-Quotienten isolierter Pankreasinseln, so stellt sich heraus, wie in Abb. 29 zu sehen ist, daß beide in Gegenwart von Glucose (2 mg/ml) unter den angegebenen Bedingungen zu einer Zunahme des NADPH/NADP-Quotienten führen, wobei Leucin den Quotienten um einen größeren Betrag erhöht (von 0,84 auf 1,28) als Arginin (von 0,84 auf 1,03) und die Steigerung durch Arginin nicht statistisch zu sichern ist.

Während durch Leucin (10 mM) in Gegenwart von Glucose (2 mg/ml) eine Erhöhung des NADH/NAD-Quotienten (von 0,25 auf 0,39) hervorgerufen wird, übt Arginin keinen Einfluß im Sinne einer Steigerung dieses Quotienten aus (Abb. 30).

Bezüglich einer Erhöhung der Insulinsekretion ist Arginin (10 - 40 mM) in Gegenwart einer substimulatorischen Glucosekonzentration von 1 mg/ml nicht signifikant wirksam, während Leucin hier bereits in 10 millimolarer Konzentration nach 30 min zu einer signifikanten Steigerung der Insulinfreisetzung führt (vergl. Abb. 13 mit Abb. 27). Die Erhöhung der bereits durch Glucose (2 mg/ml) induzierten Insulinfreisetzung nach 60 min ist bei Leucin etwas stärker ausgeprägt (von 590 auf 1037 µE IRI/ml) als bei Arginin (von 590 auf 941 µE/ml), die Steigerungsraten unterscheiden sich jedoch nicht signifikant voneinander, s. Abb. 31.

Methylenblau (2 µg/ml) führt sowohl in Gegenwart von Arginin + Glucose als auch von Leucin + Glucose zu einer Erniedrigung des NADPH/NADP-Quotienten und damit einhergehend zur Hemmung der Insulinsekretion.

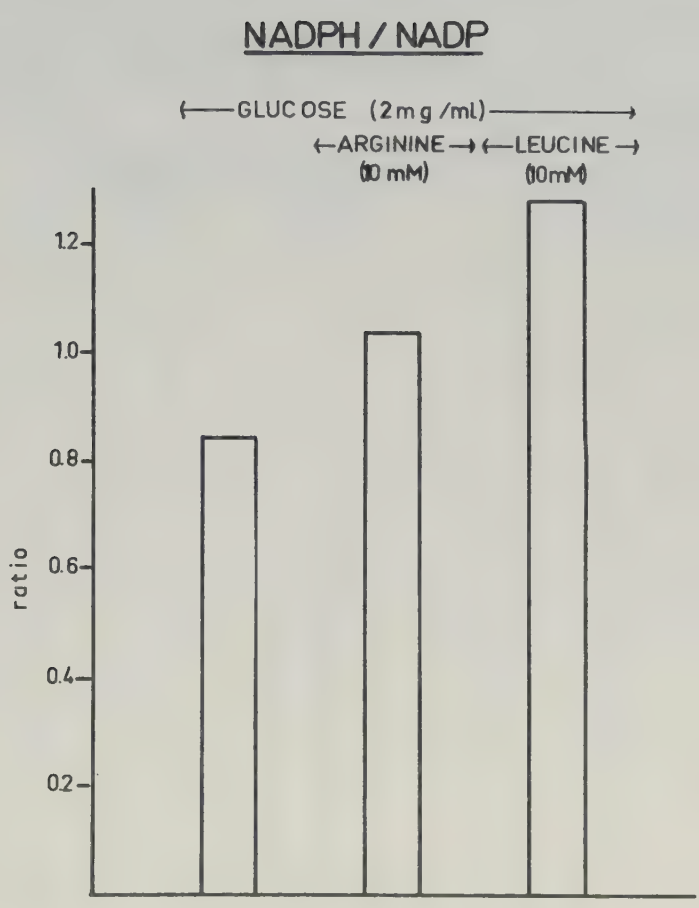


Abb. 29 : Vergleich der Wirkungen von Arginin und Leucin auf den NADPH/NADP-Quotienten isolierter Pankreasinseln der Ratte in Gegenwart von Glucose. Je 10 Inseln wurden in 0,7 ml Medium 60 min lang inkubiert.

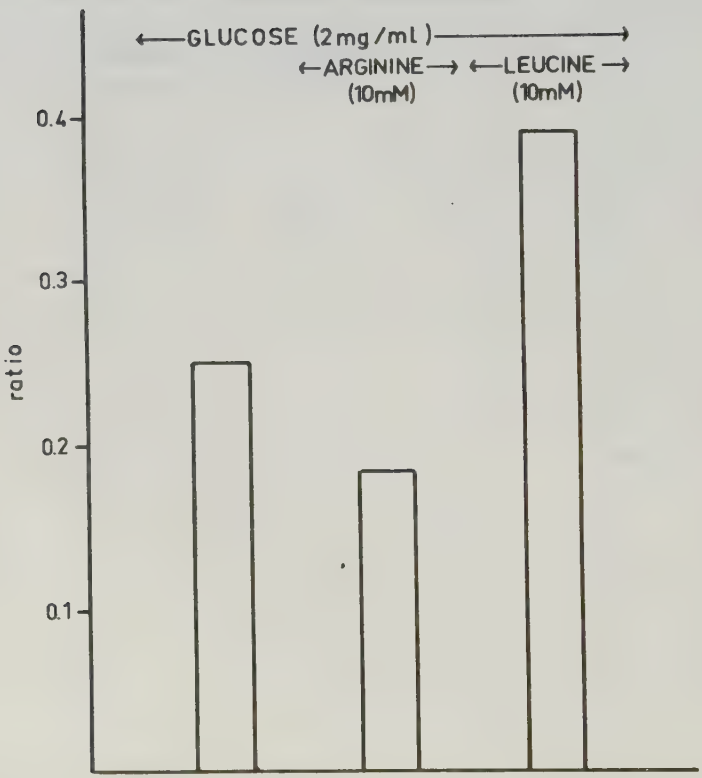


Abb. 30 : Vergleich der Wirkungen von Arginin und Leucin auf den NADH/NAD-Quotienten isolierter Pankreasinseln der Ratte in Gegenwart von Glucose. Je 10 Inseln wurden in 2 ml Medium 90 min lang inkubiert.

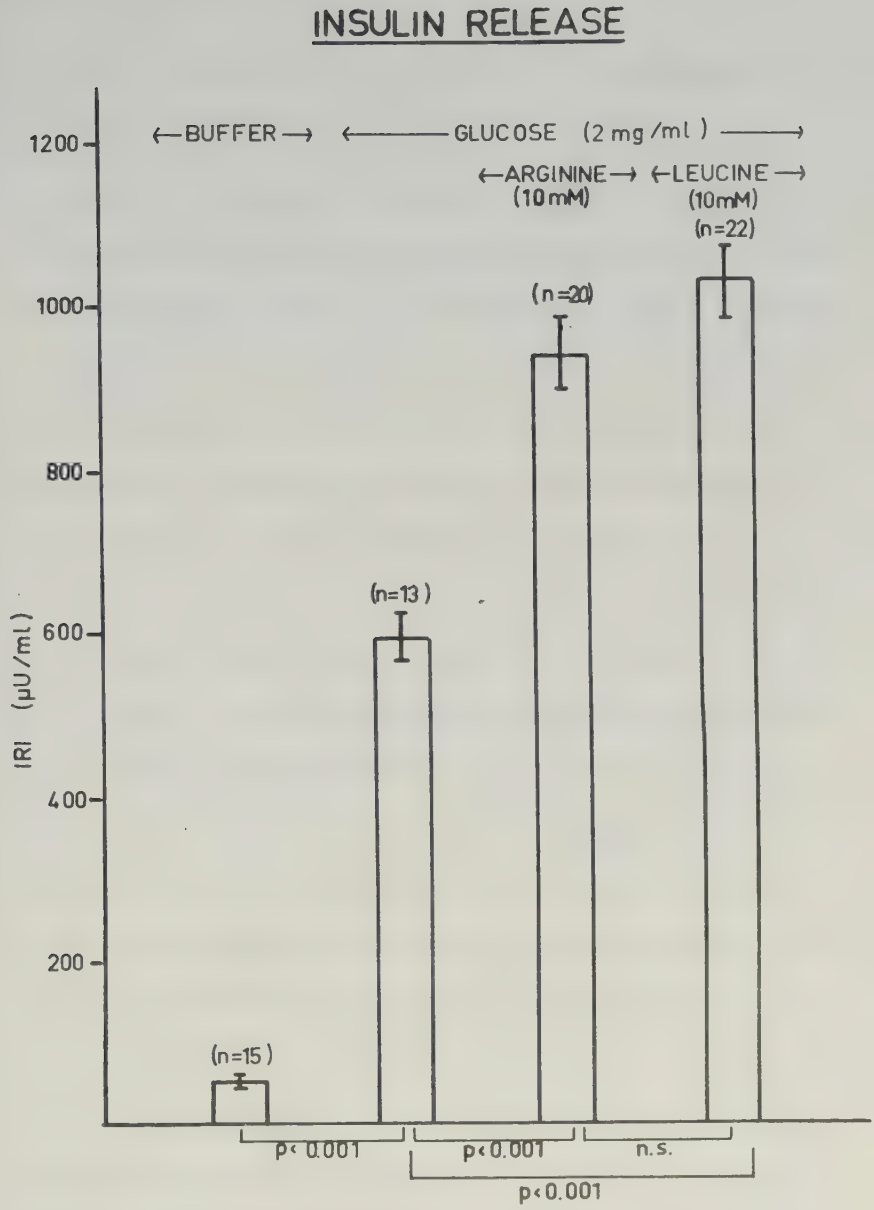


Abb. 31 : Vergleich der Wirkungen von Arginin und Leucin auf die Insulinsekretion aus isolierten Pankreasinseln der Ratte in Gegenwart von Glucose. Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 90 min lang inkubiert.

4. Diskussion

4.1 Leucin

Abb. 2 zeigt, daß Leucin (10 mM) in der Lage ist, die durch Glucose (2 mg/ml) induzierte Insulinsekretion zu erhöhen. Ähnlich synergistische Wirkungen zwischen Glucose und Leucin wurden auch von Basabe et al. (5) und von Mac Donald et al. (45) beschrieben. Inwieweit der Metabolismus einer oder beider Substanzen für diese synergistische Wirkung von Bedeutung sein könnte, wurde bereits in der Einleitung ausgeführt. Die Tatsache, daß Leucin in der ß-Zelle vollständig metabolisiert wird (46) und daß Leucinmetaboliten, wie α-KIC (47), Acetoacetat (48) und Hydroxybutyrat (3), die Insulinfreisetzung stimulieren, unterstützt die Vermutung, daß der Abbau von Leucin in der ß-Zelle einen Faktor u. a. im Mechanismus der Insulinsekretion darstellen könnte.

Auch gibt es Hinweise darauf, daß die Abbauwege des Leucins und der Glucose sich auf verschiedene Weise gegenseitig beeinflussen: So bewirkt die Anwesenheit von Glucose in stimulatorischen Konzentrationen bei Inkubation von Langerhansschen Inseln mit uniform ^{14}C-markiertem Leucin eine Verstärkung des Einbaus von markiertem Leucinkohlenstoff in Asparaginsäure, γ-Aminobuttersäure und Glutaminsäure (49). Gylfe und Sehlin (49) zeigten, daß Leucin, obwohl es nicht die Glykolyse beeinflußt, die Produktion von $^{14}CO_2$ aus uniform ^{14}C-markierter Glucose erhöht.

Auf Ergebnisse einiger Autoren, die dafürsprechen, daß der Glucosemetabolismus über den PPS für die durch Gluco-

se induzierte Insulinsekretion von Bedeutung ist, wurde bereits in der Einleitung hingewiesen, ebenso darauf, daß für die glucoseinduzierte Insulinsekretion die Bereitstellung von NADPH notwendig zu sein scheint (28-35).

Da sich aus der vorliegenden Arbeit ergab, daß der Zusatz von Leucin eine Potenzierung der glucoseinduzierten Insulinfreisetzung bewirkte (Abb. 2) und damit einhergehend auch zu einem Anstieg des insulären NADPH/NADP-Quotienten führte (Abb. 1), ist es denkbar, daß auch für die insulinfreisetzende Wirkung des Leucins dem NADPH eine Bedeutung zukommt.

Es muß allerdings vermerkt werden, daß es aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Mengen an zu analysierendem Material technisch nicht möglich war, die einzelnen Kompartimente der ß-Zelle getrennt auf ihren NADPH -Gehalt hin zu untersuchen, sondern es konnte nur eine Gesamtbestimmung des NADPH-Gehaltes von minimal 5 Pankreasinseln durchgeführt werden. Wenn es sich herausstellen sollte, daß sich der Quotient freier Pyridinnucleotide und der kompartimentierter Pyridinnucleotide unterschiedlich ändert, würde dies die Aussagekraft der Ergebnisse verschieben, diese Problematik muß jedoch vorerst offen bleiben.

Sollte es grundsätzlich der Fall sein, daß eine Erhöhung des NADPH/NADP-Quotienten einen Anstieg der Insulinsekretion aus der ß-Zelle bewirkt, müßte die Erniedrigung des NADPH/NADP-Quotienten zu einer Hemmung der durch Glucose + Leucin induzierten Insulinsekretion führen. Hier bietet sich der Einsatz von Methylenblau, einem Oxidationsmittel des NADPHs, als Hilfsstoff an (50).

Die Anwendung von Hemmstoffen als Hilfsmittel, um metabolische Prozesse zu untersuchen, birgt jedoch einige Fehlermöglichkeiten, besonders inbezug auf die Spezifität der Reaktion sowie auf die Toxizität für Stoffwechsefunktionen, was der Interpretation der erhaltenen Ergebnisse Grenzen setzt.

Im Falle des Methylenblaus liegen Daten vor, die zeigen, daß es in der in dieser Arbeit angewandten Konzentration das NADPH oxidiert, aber keinen Einfluß auf den insulären NADH-Gehalt hat (50), s. auch Abb. 7 sowie Tab. I und II dieser Arbeit. Unter den dort angegebenen Versuchsbedingungen ist also die oxidative Wirkung von Methylenblau bei den Pyridinnucleotiden spezifisch auf das NADPH beschränkt. Ein Hinweis, daß der Glucosestoffwechsel und die Energieversorgung unbeeinflußt bleiben, ergibt sich aus der Tatsache, daß Methylenblau bei Pankreasinseln nicht zur Hemmung der Glucoseoxidation führte und die ATP-Konzentration nicht veränderte (50).

Anzeichen für eine Hemmung der Insulinsynthese oder des Insulinassays gab es nicht (50).

Auch die sezernierende Funktion des Pankreas scheint nicht irreversibel geschädigt zu sein, da sich nach Vorbehandlung des perfundierten Pankreas mit MB und anschließendem Auswaschen des Hemmstoffes durch Glucose eine normale Stimulation der Insulinsekretion beobachten ließ (51).

Methylenblau (2 µg/ml) führte, wie aus Abb. 1 ersichtlich ist, in Gegenwart von Glucose + Leucin zu einer Erniedrigung des NADPH/NADP-Quotienten und tatsächlich war auch die durch Glucose + Leucin induzierbare Insulinsekretion signifikant gehemmt (Abb. 5).

Wenn diese Ergebnisse mit Methylenblau auch zeigen, daß NADPH für die insulinfreisetzende Wirkung von Leucin + Glucose notwendig ist, so lassen sie für sich gesehen jedoch keine Entscheidung darüber zu, ob die durch Leucin bewirkte Steigerung des NADPH/NADP-Quotienten die insulinfreisetzende Wirkung der Glucose oder des Leucins oder beider Substanzen erhöht.

Ein weiteres Redoxsystem, das mit der Insulinsekretion in Zusammenhang stehen könnte (52), stellt das NADH/NAD-System dar, wobei NADH vorwiegend der Glykolyse und dem Citratzyklus entstammt.

Glucose führte, wie in Tabelle V angegeben, zu einer Erhöhung des NADH/NAD-Quotienten. Bei zusätzlichen Leucingaben konnte ein weiterer Anstieg des NADH/NAD-Quotienten beobachtet werden (Abb. 6).

Der durch Glucose bewirkte Anstieg an NADH könnte sich durch eine Beschleunigung der Glykolyse ergeben haben (20), auf die Bedeutung des Glucosemetabolismus über den Glykolyseweg für die durch Glucose induzierbare Insulinsekretion wurde in der Einleitung schon hingewiesen.

Unklar ist jedoch die Ursache für die weitere Erhöhung des NADH-Gehaltes durch Leucin, da Gylfe und Sehlin (49) fanden, daß Leucin selbst die Glykolyse nicht beeinflußt. Es ist möglich, daß die durch Leucin bewirkte Erhöhung des NADH-Gehaltes die Folge einer Stimulation der insulären Glutamat-Dehydrogenase ist, die durch Leucin, so konnten Hellman (53) und Gylfe (54) nachweisen, hervorgerufen wird. Außerdem entsteht beim Abbau von Leucin NADH. Auf jeden Fall scheint die Möglichkeit zu bestehen, daß das NADH bei der Wirkung von Leucin + Glucose auf die

Insulinsekretion als beteiligter Cofaktor einbezogen wird.

Nachdem nun festgestellt worden war, daß Leucin in Gegenwart von Glucose bei gegebener Versuchsanordnung in der Lage ist, sowohl den NADPH/NADP-Quotienten als auch den NADH/NAD-Quotienten in Langerhansschen Inseln zu steigern, mußte sich eine kritische Betrachtung der in unserem Arbeitskreis üblichen Versuchsbedingungen, hier besonders in Hinblick auf die Inkubationsbedingungen, anschließen, und zwar aus folgenden Gründen:
Mehrere Autoren wiesen bereits daraufhin, daß Insulin in der Lage ist, seinen eigenen durch Glucose induzierten Sekretionsmechanismus zu hemmen (55-57).
Ammon und Verspohl (30) erzielten nach 90 minütiger Inkubation von 5 Inseln/ml in Gegenwart von 3 mg Glucose/ml bereits mit 200 µE exogenem Insulin/ml eine Hemmung des insulinfreisetzenden Glucoseeffekts, die mit einer Erniedrigung des NADPH/NADP-Quotienten, von 1,3 auf 0,9, korrelierte.
Methodisch besteht die Diskrepanz, daß einerseits die Insulinkonzentration im Medium das Integral des über die gesamte Zeit sezernierten Insulins darstellt, während es sich andrerseits bei der Bestimmung der Pyridinnucleotide um eine Momentaufnahme handelt, die die Verhältnisse zum Zeitpunkt 90 min wiedergibt. Das NADPH/NADP-System spricht jedoch relativ schnell auf Änderungen der Insulinkonzentration im Medium an, so fanden Ammon und Verspohl (30), daß der hemmende Effekt von exogenem Insulin auf den NADPH/NADP-Quotienten bereits innerhalb von 5 min nach dessen Zugabe zum Medium eingetreten war.

Die bisher diskutierten NADPH-Bestimmungen wurden nach 60 minütiger Inkubation von je 10 Inseln in 0,7 ml Medium durchgeführt, die Insulinkonzentrationen in Medium nach 90 minütiger Inkubation (Begründung s. Abschnitt 3.1.1) von je 5 Inseln /ml gemessen. Es ergab sich, wie Abb. 2 zeigt, daß sich unter diesen Bedingungen in Gegenwart von Leucin (10 mM) + Glucose (2 mg/ml) bereits 1037 uE IRI/ml im Medium angesammelt hatten.

Geht man davon aus, daß exogenes Insulin wie sezerniertes Insulin wirkt, so müßte hier bereits eine Beeinträchtigung des Zusammenwirkens von Leucin + Glucose bezüglich ihrer Erhöhung des NADPH-Gehaltes durch das im Medium akkumulierte Insulin eingetreten sein. Bei 15 minütiger Inkubation spielen diese Hemmeffekte nur eine untergeordnete Rolle, da zu dieser Zeit, wie Abb. 10 zeigt, erst 210 uE Insulin /ml Medium sezerniert wurden.

Daher wurde nun der durch Glucose + Leucin erzielte insuläre NADPH-Gehalt nach 15 minütiger Inkubation mit dem nach 90 minütiger Inkubation verglichen.

Wie aus Abb. 8 ersichtlich ist, lagen die NADPH-Konzentrationen bei 90 Minuten langer Inkubation mit Leucin + Glucose signifikant niedriger als nach 15 minütiger Inkubation. Dies läßt darauf schließen, daß ebenso, wie die durch Glucose induzierte Insulinsekretion und NADPH-Erhöhung durch exogenes Insulin gehemmt wurden (30), auch die durch Leucin + Glucose bewirkte NADPH-Erhöhung durch das inzwischen in das Medium sezernierte Insulin vermindert wurde.

Die Inkubationsdauer hatte hingegen keinen Einfluß im Sinne einer Hemmung auf den durch Leucin + Glucose

erhöhten NADH-Gehalt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Befunden von Ammon und Verspohl (30), die zeigten, daß die Glykolyse und der Citronensäurezyklus durch exogenes Insulin nicht beeinflußt werden, da in Gegenwart von Glucose exogenes Insulin weder die Oxidation von 6-^{14}C Glucose noch den NADH/NAD-Quotienten herabsetzte. Dagegen senkte exogenes Insulin die Aktivität des PPS, was durch eine signifikante Erniedrigung des [1-^{14}C]Glucose-/[6-^{14}C]Glucose-Oxidations-Quotienten angezeigt wird (30).

Glucose selbst führt dosisabhängig (1-3 mg/ml) zu einer Erhöhung des insulären NADPH-Gehaltes (33), die mit einer Steigerung der Insulinsekretion korreliert. Es erhob sich die Frage, ob, ausgehend sowohl von einem bereits erhöhten NADPH/NADP-Quotienten, wie er nach Inkubation mit 2 mg Glucose /ml vorliegt, als auch von einer bereits durch Glucose erhöhten Insulinsekretion, Leucin eine zusätzliche Steigerung der Insulinfreisetzung und des NADPH-Gehaltes in Abhängigkeit von seiner Konzentration bewirkte.

Versuche mit Leucin in 10 , 20 und 40 millimolarer Konzentration kombiniert mit 1 mg bzw. 2 mg Glucose /ml ergaben, daß Leucin (10 mM) bei gleichzeitiger Anwesenheit von 2 mg Glucose /ml , einer Konzentration, in der Glucose selbst eine insulinfreisetzende Wirkung hat, weniger effektiv bezüglich der Erhöhung des NADPH-Gehaltes und der Insulinsekretion war als in Kombination mit einer substimulatorischen Glucosekonzentration:

(Vergl. Abb. 11 mit Abb. 12, s, auch Tabelle VII)

In Gegenwart von 1 mg Glucose /ml erhöhte Leucin (10 mM) den NADPH-Gehalt signifikant, bei Anwesenheit von 2 mg Glucose /ml dagegen war nach 30 minütiger Inkubation der Anstieg nicht statistisch abzusichern. Die Insulinsekretion wurde durch Leucin (10 mM) in Gegenwart von 1 mg Glucose/ml signifikant gesteigert, bei Anwesenheit von 2 mg Glucose/ml war auch die Erhöhung der Insulinsekretion nach 30 minütiger Inkubation nicht statistisch zu belegen.

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit denen von Malaisse und Malaisse-Lagae (3), die herausfanden, daß Leucin in 10 millimolarer Konzentration in Gegenwart von 1 mg Glucose /ml Medium zu einer stärkeren Steigerung der Insulinsekretion führte als zusammen mir 1,5 oder 3 mg Glucose pro ml.

Das Auftreten von solchen "Sättigungseffekten" läßt auf wechselseitige hemmende Einflüsse von Glucose und Leucin bei bestimmten Konzentrationsverhältnissen schließen. Hierbei scheint, wie bei synergistischen Effekten der beiden Substanzen in anderen Konzentrationen, wiederum die gegenseitige Beeinflussung der Stoffwechselwege eine Rolle zu spielen.

Malaisse und Malaisse-Lagae konnten nämlich durch Blockierung des Glucosemetabolismus, indem sie Mannoheptulose, einen Hemmstoff der Glucosephosphorylierung (3), zusetzten, den "Hemmeffekt" höherer Glucosekonzentrationen auf die insulinfreisetzende Wirkung von Leucin verhindern.

Hellman et al. (46) fanden, daß Glucose dosisabhängig (5 - 17 mM) die Oxidation von Leucin (5 mM) hemmt.

Sie vermuten, daß diese hemmende Wirkung der Glucose auf die Leucinoxidation durch den Metabolismus der Glucose verursacht wird, da Mannoheptulose diese Hemmung

verhindert.

Widersprüchlich zu diesen Ergebnissen ist jedoch, daß Basabe et al. (5) auch bei höheren stimulatorischen Glucosekonzentrationen zumindest additive Effekte auf die insulinfreisetzende Wirkung des Leucins gemessen haben, doch sind die Befunde nicht direkt miteinander vergleichbar und schwer zu beurteilen, da keine Stoffwechselparameter gemessen wurden.

Bezüglich der Erhöhung der Insulinsekretion sind die Effekte aller drei eingesetzten Leucinkonzentrationen bei Kombination mit 1 mg Glucose /ml stärker ausgeprägt als die, die Leucin zusammen mit 2 mg Glucose /ml erzielte, doch werden die Steigerungsraten bei Erhöhung der Leucindosis immer kleiner, so daß Leucin in 40 millimolarer Konzentration kaum einen größeren Effekt hat als in 20 millimolarer Konzentration, und zwar sowohl in Gegenwart von 1 mg als auch von 2 mg Glucose /ml (Abb. 13).

Auffällig ist die Parallelität dieser Ergebnisse aus Untersuchungen des Einflusses verschiedener Leucinkonzentrationen auf die Insulinsekretion zu Befunden von Hellman et al. (46), die den Einfluß verschiedener Konzentrationen von Leucin auf dessen Oxidationsrate gemessen haben: Sie fanden, daß die Bildung von $^{14}CO_2$ aus markiertem Leucin durch Steigerung der Leucinkonzentration über 5 mmol/l hinaus nur noch geringfügig erhöht wurde.

Hiermit ist also wieder ein Hinweis gegeben, daß auch der Metabolismus von Leucin mit dem Ausmaß der Leucinwirkung auf die Insulinsekretion in Zusammenhang stehen könnte.

Der NADPH-Gehalt der Pankreasinseln wird durch Leucin in 10 millimolarer Konzentration erhöht, und zwar in Gegenwart von 1 mg Glucose /ml signifikant und stärker als bei Anwesenheit von 2 mg Glucose / ml Medium. Dieser relativ geringfügige Effekt bei 2 mg Glucose /ml könnte durch einen hemmenden Einfluß der höheren Glucosekonzentration entstanden sein, Vermutungen darüber und Gründe dafür wurden bereits geäußert. Nun stellte sich aber auch heraus, daß sowohl bei Kombination mit 1 mg Glucose pro ml als auch mit 2 mg Glucose/ml bei Erhöhung der Leucinkonzentration über 10 mmol/l hinaus die Leucinwirkung auf den NADPH-Gehalt abnahm, und zwar in etwas stärkerem Ausmaß bei Anwesenheit von 2 mg Glucose / ml (Abb. 11 u. 12). Dieser "Hemmeffekt" könnte durch in das Medium sezerniertes Insulin verursacht werden. Das muß jedoch nicht die einzige Erklärungsmöglichkeit sein.

Bei dieser Arbeit ging es vor allem darum, die optimalen Verhältnisse für eine Steigerung der NADPH-Konzentration durch Leucin zu finden. Wie aus Abb. 11 ersichtlich ist, war der Leucineffekt auf die NADPH-Erhöhung am deutlichsten bei 30 minütiger Inkubation von je 5 Inseln in 1 ml Medium in Gegenwart von Leucin in 10 millimolarer Konzentration kombiniert mit einer Glucosekonzentration von 1 mg/ml.

Eine wichtige Quelle zur Bildung von NADPH stellt der PPS dar. Nach Untersuchungen von Ammon und Verspohl (30) korreliert sowohl die Aktivität des PPS als auch die Höhe des NADPH/NADP-Quotienten mit der Glucosekonzentration, so daß zumindest beim Glucosemetabolismus die Aktivität des PPS die Höhe dieses Quotienten maßgeblich be-

stimmen könnte. Da auch Leucin zur Zunahme des NADPH/NADP-Quotienten führt, sollte untersucht werden, ob diese Wirkung des Leucins möglicherweise auf eine Stimulation des PPS zurückzuführen ist. NADPH wird sowohl bei der Umsetzung von G-6-P zu 6-PG als auch bei der darauffolgenden weiteren Oxidation des 6-PG zu Ribulose-5-phosphat gebildet.

Von Montague und Taylor (58) sowie von Akhtar et al. (44) wurde mit zunehmender Glucosekonzentration eine Zunahme von 6-PG als Ausdruck einer erhöhten Aktivität des PPS gefunden (s. auch Abb. 14 dieser Arbeit). Die Steigerung des insulären 6-PG-Gehaltes könnte die Folge einer Beschleunigung der enzymatischen Dehydrierung des G-6-Ps sein. Es wurde daher untersucht, ob sich eine solche Zunahme auch durch Leucin erzielen läßt. Wie Abb. 15 zeigt, war dies jedoch nicht der Fall. Letzteres spricht also nicht für den PPS als Quelle für die durch Leucin bewirkte Erhöhung des NADPH/NADP-Quotienten. Vorläufige Untersuchungen in unserem Labor, bei denen der Einfluß von Leucin auf die Aktivität des PPS der Langerhansschen Insel unter Verwendung der Methode von Katz und Wood (Messung der Bildung von $^{14}CO_2$ und THO aus [1-^{14}C] und [6-^{14}C] sowie [5-^{3}H] Glucose) (59) gemessen wurde, ergaben (unveröffentlichte Daten) bisher ebenfalls keinen Hinweis auf eine mögliche Wirkung von Leucin auf den PPS.

In Übereinstimmung damit sind Beobachtungen von Mac Donald et al. (45), nach denen selbst bei Hemmung des PPS durch 6-AN die durch Leucin induzierbare Insulinsekretion nicht gehemmt war.

Möglicherweise führt Leucin also auf andere Weise als durch Erhöhung der Aktivität des PPS zur Zunahme des NADPH/NADP-Quotienten.
Da zum einen beim Abbau von Leucin NADH entsteht und zum anderen Transdehydrogenasen eine Übertragung des Wasserstoffs von NADH auf NADP ermöglichen, könnte es sein, daß es durch eine Steigerung des NADH-Gehaltes zu einem Anstieg des NADPH-Gehaltes kommt. Wie die Abb. 6 zeigt, führt Leucin zu einer Zunahme von NADH. Inwieweit NADH am Mechanismus der durch Leucin induzierten Insulinsekretion beteiligt ist, läßt sich auf Grund bisheriger Befunde nicht sagen. Daß jedoch das NADPH, selbst wenn es durch das NADH bereitgestellt wurde, für den Sekretionsmechanismus von Bedeutung ist, ergibt sich aus der Beobachtung, daß durch Methylenblau sowohl der NADPH/NADP-Quotient als auch die Insulinsekretion vermindert werden, nicht jedoch der NADH/NAD-Quotient.

Abschließend wäre zu überlegen, auf welche Weise überhaupt ein Anstieg des NADPH/NADP-Quotienten an eine Erhöhung der Insulinsekretion gekoppelt sein könnte.
Folgende Befunde, die in diesem Zusammenhang von Interesse sind, sollen hier Erwähnung finden:
Die insulinfreisetzende Wirkung von p-Chlormercuribenzoat, einer Verbindung, die ihren Effekt durch Reaktion mit freien SH-Gruppen auf der ß-Zellmembran auslösen soll (60), wird durch Methylenblau, einem Oxidationsmittel für NADPH, signifikant gehemmt (47).
Freie SH-Gruppen auf oder in der Membran der ß-Zelle sollen zumindest zum Teil im Gleichgewicht mit intrazellulärem reduzierten Glutathion (GSH) stehen bzw. durch

dieses im reduzierten Zustand gehalten werden (61,62). Für die Reduktion von Glutathion (GSSG) selbst durch die Glutathionreduktase fungiert NADPH als spezifischer Wasserstoffdonator (63).

Da, aufgrund der Versuche mit Methylenblau, die insulinfreisetzende Wirkung von p-CMB also vom insulären NADPH-Gehalt abzuhängen scheint, könnte beim Mechanismus der Insulinfreisetzung dem NADPH die Aufgabe zukommen, über die Reduktion des intrazellulären Glutathions SH-Gruppen auf/in der Membran der ß-Zelle im reduzierten Zustand zu halten.

Für das Bestehen eines solchen Zusammenhanges spricht, daß bei Erniedrigung des intrazellulären GSH-Gehaltes, wie sie durch Diamid, das GSH und andere Thiole oxidiert (62,64,65), und t-BHP, das zur Erniedrigung des GSH-Gehaltes führt, indem es als Substrat der Glutathionperoxidase fungiert (66.67), zu erzielen ist (68, 69), gleichermaßen die durch p-CMB, Glucose, p-CMB + Glucose, Leucin + Glucose und p-CMB + Leucin + Glucose induzierte Insulinsekretion gehemmt ist (44,51).

Bereits Pagliara et al. (70) vermuteten, daß Glucose und SH-Reagenzien eine Insulinfreisetzung bewirken, indem sie mit SH-Gruppen in der ß-Zellmembran, die mit Rezeptorproteinen in Verbindung stehen, reagieren. Auf die Möglichkeit, daß die insulinfreisetzende Wirkung von Glucose und anderen Verbindungen durch ihre Interaktionen mit spezifischen Rezeptoren in der ß-Zellmembran ausgelöst wird, haben Christensen und Cullen (71), Cerasi und Luft (72), Matschinsky et al. (73), Hellman et al. (74) und Ashcroft et al. (13) hingewiesen.

Auf Grund all dieser und unserer Ergebnisse könnte folgende Hypothese aufgestellt werden:
Leucin bewirkt durch die erhöhte Bereitstellung des insulären NADPHs, daß das intrazelluläre Glutathion in vermehrtem Maße im reduzierten Zustand gehalten wird, wodurch in der Zellmembran vermehrt Disulfidbrücken von (Rezeptor-?)Proteinen gespalten und reduziert werden, was zu einer Vermehrung von SH-Gruppen in der Membran führt. Dadurch würde die Empfindlichkeit der ß-Zelle gegenüber einem insulinsekretionsauslösenden Reiz von Leucin, Glucose oder Leucin + Glucose erhöht werden.
Eine Vermehrung reduzierter SH-Gruppen könnte dabei zur Folge haben, daß die Ionenpermeabilität der ß-Zellmembran gesteigert ist (75). Matthews und Deans (76) stellen nach elektrophysiologischen Untersuchungen die Vermutung an, daß Stimulatoren der Insulinsekretion zu einer Konformationsänderung der ß-Zellmembran führen, was eine Änderung des Ionenfluxes nach sich zieht, woraufhin es dann zu einer Aktivierung des Mechanismus der Insulinfreisetzung kommt.

4.2 Arginin

Arginin bewirkt, wie Abb. 17 zeigt, eine Steigerung der durch Glucose induzierten Insulinsekretion. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit denen von Basabe et al. (5) und Efendic et al. (77). Grundsätzlich scheint die Fähigkeit des Arginins, zu einer Insulinfreisetzung zu führen, im Vergleich zu Leucin stärker von der Anwesenheit der Glucose abzuhängen (7). Doch ist Arginin in 26 millimolarer Konzentration auch in der Lage, in Abwesenheit von Glucose eine Sekretion von Insulin hervorzurufen (5). Levin et al. (8) berichten, daß Arginin sogar in nur 3 millimolarer Konzentration, am perfundierten Pankreas zu einer Insulinsekretion auch in Abwesenheit von Glucose führt, jedoch zeigt sie keinen biphasischen Verlauf, wie er durch Arginin + Glucose hervorgerufen wird. Levin et al. (8) wiesen außerdem daraufhin, daß Arginin zusammen mit Glucose in mittleren Konzentrationen, 0,5 - 1,5 mg/ml, die deutlichste Erhöhung der Insulinsekretion bewirkte, jedoch kaum Effekte ausübte, wenn das Pankreas bereits maximal durch Glucose (3 - 5 mg/ml) stimuliert war.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde nach 30 minütiger Inkubation von je 5 Inseln /ml Medium mit Arginin in 10, 20 und 40 millimolarer Konzentration + Glucose, 1 mg/ml, kein nennenswerter Anstieg der Insulinsekretion gemessen. Bei Erhöhung der Glucosekonzentration auf 2 mg/ml konnte durch Arginin in einer Konzentration von 10 mmol/l eine signifikante Steigerung der Insulinfreisetzung erzielt werden, bei höheren Argininkonzentrationen (20 und 40 mM) war demgegenüber kein weiterer signifikanter Anstieg zu beobachten.

Also auch hier scheinen, wie beim Leucin, "Sättigungseffekte" aufzutreten.

Einen Fall von gegenseitiger negativer Beeinflussung von Glucose und Arginin schildert auch Levin:

Bei 15 minütiger Argininvorbehandlung des perfundierten Pankreas bewirkt im Anschluß daran zugesetzte Glucose nur eine abgeschwächte monophasische Insulinsekretion (8). Hier stellt sich also wieder die Frage nach der Ursache solcher Interaktionen.

Der Metabolismus des Arginins spielt hierbei wahrscheinlich kaum eine Rolle, denn sowohl in Abwesenheit als auch bei Anwesenheit von Glucose wurde von Hellman et al. (46) nur eine äußerst geringe Argininoxidation in der ß-Zelle gemessen.

Eine Änderung der Fluoreszens reduzierter Pyridinnucleotide durch Arginin konnte von Panten und Christians (78) nicht festgestellt werden.

Inder vorliegenden Arbeit wurde zwar, parallel zur Stimulierung der Insulinsekretion eine Erhöhung des NADPH-Gehaltes durch Arginin erzielt, sie war aber weniger ausgeprägt als die durch Leucin bewirkte Steigerung und statistisch nicht signifikant. Bei Erniedrigung des NADPH/NADP-Quotienten durch Zusatz von Methylenblau, einem Oxidationsmittel für NADPH, war allerdings die durch Arginin + Glucose induzierte Insulinsekretion vermindert (Abb. 18 und 19). Der NADH/NAD-Quotient wurde durch Arginin nicht verändert (Abb. 20), was mit der Aussage von Ashcroft et al. (10), daß Arginin die Oxidation von $U^{14}C$-Glucose nicht beeinflußt, in Einklang steht.

Dies läßt vermuten, daß Arginin nicht durch Bereitstellung von Metaboliten des eigenen Stoffwechsels oder des Glucosestoffwechsels die durch Glucose induzierte Insulinsekretion erhöht. Doch ist es möglich, daß die Glucose durch Bereitstellung von Metaboliten oder Cofaktoren aus ihrem eigenen Stoffwechsel die insulinfreisetzende Wirkung von Arginin vermittelt, denn obwohl Arginin selbst nicht zu einer signifikanten Erhöhung des NADPH-Gehaltes führt, braucht es doch das NADPH, wie aus den Versuchen mit Methylenblau hervorgeht, um die Insulinsekretion zu steigern.
So könnte sich auch erklären, wieso die Fähigkeit des Arginins, die Insulinsekretion zu stimulieren, an die Anwesenheit von Glucose gebunden ist.
Da festgestellt werden konnte, daß die insulinfreisetzende Wirkung sowohl von Glucose allein als auch von Glucose + Arginin durch Methylenblau einerseits (Abb. 19) und durch Diamid und t-BHP andererseits (51,79)(s.a.4.1) gehemmt wird und ebenso sowohl die durch Glucose + p-CMB als auch die durch Glucose + Arginin + p-CMB induzierte Insulinfreisetzung durch t-BHP erniedrigt wird (79), ist es möglich, daß, wie beim Leucin ausführlich beschrieben, ein Zusammenhang besteht zwischen der durch Glucose + Arginin induzierten Insulinfreisetzung, dem GSH/GSSG- und dem NADPH/NADP-System.

Die Frage, auf welche Weise Arginin, wenn nicht durch Beteiligung des eigenen Metabolismus oder durch Beeinflussung des Glucosemetabolismus, mit dem Insulinsekretionsmechanismus in Verbindung kommt, wurde auch von Efendic et al. (77) und Milner (7) diskutiert:

Da die insulinfreisetzende Wirkung des Arginins durch Aminophyllin, einem Phosphodiesterasehemmstoff, der zu einer Erhöhung des c-AMP-Spiegels in der Zelle führt, potenziert wird (7), ist vermutlich das c-AMP-System auch an dem durch Arginin + Glucose induzierten Insulinsekretionsmechanismus beteiligt.
Arginin ist ein Stimulator der Glucagonsekretion aus den α-Zellen (80), das Glucagon wiederum führt, nur in Gegenwart von extrazellulärer Glucose, durch Erhöhung des c-AMP-Spiegels zur Insulinsekretion (81), somit wäre es denkbar, daß Arginin indirekt durch Stimulierung der Glucagonsekretion die Insulinfreisetzung bewirkt.

Stellt man sich abschließend noch die Frage nach der physiologischen Bedeutung einer durch Aminosäuren ausgelösten Insulinsekretion, so ergibt sich die Antwort aus den Tatsachen, daß Insulin den Transfer von Aminosäuren durch Zellmembranen begünstigt, die Proteinbiosynthese steigert und die Proteolyse hemmt.
So fördern postbrandial die Aminosäuren indirekt ihre eigene Aufnahme in die Zellen und dort ihre Verwertung zum Aufbau von körpereigenem Eiweiß.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob und in welchem Maße die Aminosäuren Leucin und Arginin zusammen mit Glucose die Insulinsekretion und das Redoxgleichgewicht des NADPH/NADP-Systems sowie des NADH/NAD-Systems in Langerhansschen Inseln der Ratte beeinflussen. Dabei wurden folgende Ergebnisse erhalten:

A: Leucin führt in Gegenwart von Glucose zu einer Steigerung der Insulinfreisetzung, die mit einem Anstieg des insulären Gehaltes an NADPH einhergeht. Die NADP-Konzentration nimmt ab, so daß sich eine Zunahme des NADPH/NADP-Quotienten ergibt.

B: Der Gehalt an NADH in den Langerhansschen Inseln wird ebenfalls durch Leucin gesteigert, der NAD-Gehalt ändert sich nicht und somit errechnet sich eine Zunahme des NADH/NAD-Quotienten.

C: Methylenblau, ein Oxidationsmittel für NADPH, führt in Gegenwart von Leucin + Glucose zu einer Abnahme des NADPH/NADP-Quotienten.

D: Auch die durch Leucin + Glucose induzierte Insulinsekretion wird durch Methylenblau gehemmt.

E: Methylenblau hat jedoch keinen Einfluß auf den durch Leucin + Glucose hervorgerufenen Anstieg des NADH/NAD-Quotienten.

F: Untersuchungen über den Einfluß der Inkubationsdauer auf den Gehalt an NADPH ergaben, daß nach 90 minütiger Inkubation der Inseln mit Leucin und Glucose der NADPH-Gehalt niedriger ist als nach 15 minütiger Inkubation unter denselben Bedingungen.

Es wurde vermutet, daß die Abnahme des NADPH-Gehaltes auf einen hemmenden Einfluß des während 90 min im Medium akkumulierten Insulins zurückzuführen sei.

G: Die Inkubationsdauer hat in Gegenwart von Leucin + Glucose keinen Einfluß auf den insulären NADH-Gehalt.

H: Die Wirkung des Leucins sowohl auf die Insulinfreisetzung als auch inbezug auf die Erhöhung des NADPH-Gehaltes ist in Gegenwart substimulatorischer Glucosekonzentrationen deutlicher als in Kombination mit Glucose in einer Konzentration, in der sie selbst zur Insulinfreisetzung führt.

I: Eine Erhöhung der Leucinkonzentration über 10 mmol/l hinaus führt nicht zu einem weiteren Anstieg des NADPH-Gehaltes. Die Insulinsekretion läßt sich durch Leucin oberhalb einer Konzentration von 20 mmol/l nicht weiter steigern.

K: Arginin verstärkt die durch Glucose induzierte Insulinsekretion, führt aber bei Anwesenheit von Glucose nicht zu einer signifikanten Steigerung des NADPH/NADP-Quotienten.

L: Der NADH-Gehalt und der NAD-Gehalt der Langerhansschen Inseln werden durch Arginin in Gegenwart von Glucose nicht beeinflußt.

M: Mit Methylenblau wird auch die durch Arginin + Glucose induzierte Insulinsekretion gehemmt.

N: Der Hemmstoff hat in Gegenwart von Arginin + Glucose keinen Einfluß auf den insulären NADH-Gehalt.

O: Nach 90 minütiger Inkubation von Langerhansschen Inseln mit Arginin + Glucose wurde ein geringerer NADPH-Gehalt gemessen als nach 15 minütiger Inkubation.

P: Der NADH-Gehalt wird bei Anwesenheit von Arginin + Glucose durch die Inkubationsdauer nicht verändert.

Q: Arginin führt in Gegenwart substimulatorischer Glucosekonzentrationen weder zu einer Steigerung der Insulinsekretion noch zur Erhöhung des NADPH-Gehaltes, verstärkt aber die durch Glucose induzierte Insulinsekretion. Ein signifikanter Anstieg des NADPH-Gehaltes konnte durch Arginin auch zusammen mit stimulatorischen Mengen Glucose nicht erzielt werden.

R: Glucose führt dosisabhängig zu einer Zunahme des 6-Phosphogluconat/Glucose-6-phosphat-Quotienten, Leucin jedoch nicht.

Schlußfolgerung: Die Ergebnisse weisen daraufhin, daß sowohl Leucin als auch Arginin für ihre insulinfreisetzende Wirkung das NADPH benötigen. Leucin führt selbst zu einer Vermehrung von NADPH, dies könnte ein Grund dafür sein, daß es auch in Gegenwart substimulatorischer Glucosekonzentrationen die Insulinsekretion erhöht, wohingegen Arginin, das den NADPH-Gehalt nicht signifikant steigert, mit höheren Glucosekonzentrationen als Leucin kombiniert werden muß (der NADPH/NADP-Quotient hängt auch von der Glucosekonzentration ab), um zu einer Verstärkung der Insulinfreisetzung zu führen.
Die Ursache für die durch Leucin bewirkte Zunahme von NADPH ist nicht in einer Beschleunigung des PPS zu suchen, seine Bildung aus NADH wird erörtert.

Es wird die Möglichkeit diskutiert, daß ein Zusammenhang besteht zwischen dem NADPH/NADP-Redoxgleichgewicht, dem intrazellulären GSH und Thiolgruppen auf/in der ß-Zellmembran, die am Mechanismus der Insulinsekretion beteiligt sind.

Auf die physiologische Bedeutung einer Stimulierung der Insulinsekretion durch Aminosäuren wird hingewiesen.

6. Anhang

Auf den Tabellen I - IX wurden alle Ergebnisse der einzelnen Versuchsserien dieser Arbeit dargestellt.

	pmol/10 Inseln NADPH	pmol/10 Inseln NADP	NADPH+NADP	NADPH/NADP	µE/ml Insulin	statistische Auswertung:
Glucose (2 mg/ml)	a) 1,17 ± 0,05 (n=19)	g) 1,39 ± 0,09 (n=26)	2,56	0,84	n) 590 ± 37 (n=13)	ab: P<0,01 ac: n. s. ad: P<0,001 be: P<0,001 cf: P<0,001
Glucose (2 mg/ml) + Leucin (10 mM)	b) 1,40 ± 0,07 (n=17)	h) 1,09 ± 0,06 (n=29)	2,49	1,28	o) 1037 ± 69 (n=22)	gh: P<0,01 gi: n. s. gk: n. s. hl: P<0,001 im: P<0,001
Glucose (2 mg/ml) + Arginin (10 mM)	c) 1,36 ± 0,09 (n=18)	i) 1,32 ± 0,09 (n=26)	2,68	1,03	p) 941 ± 39 (n=20)	no: P<0,001 np: P<0,001 nq: P<0,001 or: P<0,001 ps: P<0,001
Glucose (2 mg/ml) + Methylenblau (2µg/ml)	d) 0,64 ± 0,05 (n=20)	k) 1,58 ± 0,1 (n=23)	2,22	0,40	q) 336 ± 5[illegible] (n=15)	
Glucose (2 mg/ml) + Leucin (10 mM) + Methylenblau (2µg/ml)	e) 0,53 ± 0,07 (n=18)	l) 1,75 ± 0,1 (n=18)	2,28	0,30	r) 615 ± 59 (n=18)	
Glucose (2 mg/ml) + Arginin (10 mM) + Methylenblau (2µg/ml)	f) 0,76 ± 0,10 (n=20)	m) 2,07 ± 0,1 (n=18)	2,83	0,37	s) 531 ± 41 (n=20)	

Tabelle I : Einfluß von Glucose, Leucin, Arginin und Methylenblau auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln der Ratte an NADPH, NADP und deren NADPH/NADP-Quotienten sowie auf die Insulinsekretion. Für die Bestimmung der Pyridinnucleotide wurden je 10 Inseln in 0,7 ml 60 min, für die Bestimmung der Insulinsekretion wurden je 5 Inseln in 1 ml 90 min lang inkubiert. Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche

	pmol/10 Inseln				
	NADH	NAD	NADH+NAD	NADH/NAD	statistische Auswertung
ohne Zusatz	a) 0,79 ± 0,30 (n=9)	g) 4,25 ± 0,46 (n=4)	5,04	0,18	ab: n. s. bc: P<0,01 ad: P<0,001 be: P<0,01 cf: n. s. gh: n. s. hi: n. s. gk: P<0,05 hl: n. s.
Glucose (2 mg/ml)	b) 1,26 ± 0,10 (n=10)	h) 4,96 ± 0,51 (n=4)	6,22	0,25	
Glucose (2 mg/ml) + Leucin (10 mM)	c) 1.97 ± 0,18 (n=10)	i) 5,01 ± 0,42 (n=6)	6,98	0,39	
Methylenblau (2µg/ml)	d) 2,34 ± 0,40 (n=3)	k) 2,02 ± 0,69 (n=4)	4,36	1,15	
Glucose (2 mg/ml) + MB (2 µg/ml)	e) 2,08 ± 0,09 (n=3)	l) 4,49 ± 0,20 (n=4)	6,56	0,39	
Glucose (2 mg/ml) + Leucin (10 mM) + MB (2 µg/ml)	f) 2,27 ± 0,31 (n=3)	m) 4,52 ± 0,53 (n=4)	6,79	0,50	

Tabelle II : Einfluß von Leucin, Glucose und Methylenblau auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln der Ratte an NADH und NAD sowie deren NADH/NAD-Quotienten.
Je 10 Inseln wurden in 2 ml Medium 90 min lang inkubiert.
Mittelwerte ± SEM, n = Anzahl der Versuche.

	pmol/10 Inseln				
	NADH	NAD	NADH+NAD	NADH/NAD	statistische Auswertung:
ohne Zusatz	a) 0,82 ± 0,15 (n=9)	e) 8,00 ± 0,70 (n=9)	8,82	0,12	ab: n. s. bc: n. s. cd: n. s. ef: n. s. fg: n. s. gh: n. s.
Glucose (2 mg/ml)	b) 1,02 ± 0,15 (n=24)	f) 7,09 ± 0,75 (n=21)	8,11	0,14	
Glucose (2 mg/ml) + Arginin (10 mM)	c) 1,18 ± 0,17 (n=28)	g) 6,97 ± 0,80 (n=21)	8,15	0,17	
Glucose (2 mg/ml) + Aginin (10 mM) + Methylenblau (2 µg/ml)	d) 1,24 ± 0,24 (n=16)	h) 6,68 ± 0,81 (n=19)	7,92	0,19	

Tabelle III : Einfluß von Arginin, Glucose und Methylenblau auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln der Ratte an NADH und NAD sowie deren NADH/NAD-Quotienten.
Je 10 Inseln wurden in 2 ml Medium 15 min lang inkubiert.
Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche

	pmol/10 Inseln				µE/ml	statistische
	NADPH	NADP	NADPH+NADP	NADPH/NADP	Insulin	Auswertung
15 Minuten						
ohne Zusatz	a) 1,34 ± 0,14 (n=19)	i) 1,95 ± 0,11 (n=12)	3,29	0,69	r) 81 ± 29 (n=6)	ab: n. s. bc: n. s. bd: n. s. ef: n. s. fg: n. s. fh: n. s. bf: P<0,02 cg: P<0,02 dh: P<0,001 ik: n. s. kl: n. s. km: n. s. ko: n. s. lp: n. s. nq: n. s. no: P<0,05 op: n. s. oq: n. s. rs: n. s. st: P<0,05 su: n. s. vw: P<0,02 wx: n. s. wy: n. s. rv: n. s. sw: n. s. tx: P<0,02 uy: P<0,05
Glucose (2 mg/ml)	b) 1,47 ± 0,12 (n=22)	k) 1,96 ± 0,15 (n=11)	3,43	0,75	s) 115 ± 17 (n=5)	
Glucose (2 mg/ml) + Leucin (10 mM)	c) 1,45 ± 0,12 (n=19)	l) 1,76 ± 0,14 (n=15)	3,21	0,75	t) 210 ± 35 (n=6)	
Glucose (2 mg/ml) + Arginin (10 mM)	d) 1,55 ± 0,09 (n=20)	m) 1,96 ± 0,17 (n=14)	3,51	0,79	u) 242 ± 54 (n=6)	
90 Minuten						
ohne Zusatz	e) 0,95 ± 0,20 (n=14)	n) 2,13 ± 0,16 (n=12)	3,08	0,45	v) 108 ± 19 (n=7)	
Glucose (2 mg/ml)	f) 1,14 ± 0,13 (n=19)	o) 1,69 ± 0,14 (n=12)	2,83	0,67	w) 574 ± 177 (n=7)	
Glucose (2 mg/ml) + Leucin (10 mM)	g) 1,15 ± 0,07 (n=23)	p) 1,49 ± 0,10 (n=13)	2,64	0,77	x) 900 ± 227 (n=7)	
Glucose (2 mg/ml) + Arginin (10 mM)	h) 1,13 ± 0,07 (n=22)	q) 2,06 ± 0,17 (n=13)	3,19	0,55	y) 901 ± 200 (n=7)	

Tabelle IV : Einfluß der Inkubationsdauer auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln der Ratte an NADPH und NADP sowie auf deren NADPH/NADP-Quotienten und auf die Sekretion von Insulin in Gegenwart von Glucose, Leucin und Arginin.

Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 15 bzw. 90 min inkubiert. Mittelwerte ± SEM;n=Anzahl d.Vers.

	pmol/10 Inseln				
15 Minuten	NADH	NAD	NADH+NAD	NADH/NAD	statistische Auswertung:
ohne Zusatz	a) 0,51 ± 0,09 (n=9)	g) 4,63 ± 0,59 (n=5)	5,17	0,11	ab: P<0,001
Glucose (2 mg/ml)	b) 1,14 ± 0,12 (n=9)	h) 4,52 ± 0,54 (n=5)	5,66	0,25	bc: P<0,05
Glucose (2 mg/ml) + Leucin (10 mM)	c) 1,89 ± 0,29 (n=12)	i) 4,92 ± 0,13 (n=6)	6,81	0,38	de: n. s. ef: P<0,001 ad: n. s. be: n. s. cf: n. s.
90 Minuten					gh: n. s. hi: n. s.
ohne Zusatz	d) 0,79 ± 0,30 (n=9)	k) 4,25 ± 0,46 (n=4)	5,04	0,18	kl: n. s.
Glucose (2 mg/ml)	e) 1,26 ± 0,10 (n=10)	l) 4,96 ± 0,51 (n=4)	6,22	0,25	lm: n. s. gk: n. s. hl: n. s.
Glucose (2 mg/ml) + Leucin (10 mM)	f) 1,97 ± 0,18 (n=10)	m) 5,01 ± 0,42 (n=6)	6,98	0,39	im: n. s.

Tabelle V : Einfluß der Inkubationsdauer auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln der Ratte an NADH und NAD sowie deren NADH/NAD-Quotienten in Gegenwart von Glucose und Leucin.
Je 10 Inseln wurden in 2 ml 15 bzw. 90 min lang inkubiert.
Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche

	pmol/10 Inseln				
	NADH	NAD	NADH+NAD	NADH/NAD	statistische Auswertung
15 Minuten					
Glucose (2 mg/ml)	a) 1,02 ± 0,15 (n=24)	e) 7,09 ± 0,75 (n=21)	8,11	0,14	ab: n. s. ac: P<0,02 cd: P<0,02
Glucose (2 mg/ml) + Arginin (10 mM)	b) 1,18 ± 0,17 (n=28)	f) 6,97 ± 0,80 (n=21)	8,15	0,17	ef: n. s. eg: n. s. gh: n. s.
90 Minuten					
Glucose (2 mg/ml)	c) 1,64 ± 0,2 (n=11)	g) 5,78 ± 0,79 (n=12)	7,42	0,28	
Glucose (2 mg/ml) + Arginin (10 mM)	d) 1,03 ± 0,1 (n=12)	h) 5,81 ± 0,99 (n=12)	6,84	0,18	

Tabelle VI : Einfluß der Inkubationsdauer auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln der Ratte an NADH und NAD sowie deren NADH/NAD-Quotienten in Gegenwart von Glucose und Arginin.
Je 10 Inseln wurden in 2 ml Medium 15 bzw. 90 min lang inkubiert.
Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche

Glucose (mg/ml)	Leucin (mM)	NADPH (pmol/10 Inseln)	Insulin (μE/ml)	statistische Auswertung:
1	0	a) 0,82 ± 0,07 (n=12)	r) 80 ± 25 (n=12)	ab: P<0,01 ac: P<0,01 ad: n. s. ef: n. s. eg: n. s. eh: n. s. ae: n. s. bf: n. s. cg: n. s. dh: n. s. rv: P<0,05 rs: P<0,05 rt: P<0,01 ru: P<0,02 vw: n. s. vx: P<0,02 vy: P<0,001
1	10	b) 1,27 ± 0,12 (n=13)	s) 166 ± 20 (n=8)	
1	20	c) 1,16 ± 0,09 (n=12)	t) 234 ± 49 (n=8)	
1	40	d) 0,93 ± 0,08 (n=12)	u) 208 ± 45 (n=7)	
2	0	e) 0,91 ± 0,11 (n=13)	v) 176 ± 38 (n=12)	
2	10	f) 1,24 ± 0,11 (n=10)	w) 251 ± 38 (n=7)	
2	20	g) 1,09 ± 0,09 (n=12)	x) 401 ± 81 (n=8)	
2	40	h) 0,95 ± 0,06 (n=12)	y) 415 ± 41 (n=9)	

Tabelle VII : Einfluß von Leucin und Glucose auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln der Ratte an NADPH sowie auf die Sekretion von Insulin in Abhängigkeit von der Konzentration.
Je 10 Inseln wurden in 2 ml Medium 30 min lang inkubiert. Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche

Glucose (mg/ml)	Arginin (mM)	NADPH (pmol/10 Inseln)	Insulin (µE/ml)	statistische Auswertung:
1	0	a) 1,04 ± 0,08 (n=13)	r) 80 ± 25 (n=12)	ab: n. s. ac: n. s. ad: n. s. ef: n. s. eg: n. s. eh: n. s. ae: n. s. bf: P<0,02 cg: n. s. dh: n. s.
1	10	b) 1,06 ± 0,09 (n=15)	s) 76 ± 35 (n=7)	
1	20	c) 1,13 ± 0,05 (n=14)	t) 95 ± 33 (n=8)	
1	40	d) 1,15 ± 0,08 (n=13)	u) 86 ± 30 (n=9)	
2	0	e) 1,25 ± 0,09 (n=14)	v) 176 ± 90 (n=12)	
2	10	f) 1,39 ± 0,10 (n=14)	w) 400 ± 41 (n=9)	rs: n. s. rt: n. s. ru: n. s. vw: P<0,02 vx: P<0,001 vy: P<0,02
2	20	g) 1,18 ± 0,08 (n=16)	x) 501 ± 50 (n=9)	
2	40	h) 1,05 ± 0,07 (n=15)	y) 415 ± 53 (n=10)	

Tabelle VIII: Einfluß von Arginin und Glucose auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln der Ratte an NADPH sowie auf die Insulinsekretion in Abhängigkeit von der Konzentration.
Je 10 Inseln wurden in 2 ml Medium 30 min lang inkubiert. Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche

	pmol/10 Inseln		6-PG/G-6P	statistische Auswertung:
	6-PG	G-6-P		
Glucose (1 mg/ml	a) 0,74 ± 0,12 (n=37)	f) 1,38 ± 0,11 (n=16)	0,54	ab: P<0,02 ac: P<0,001 ad: n. s. be: n. s. fg: P<0,02 fh: P<0,001 fi: n. s. gk: n. s.
Glucose (2 mg/ml)	b) 1,23 ± 0,15 (n=38)	g) 1,91 ± 0,17 (n=16)	0,64	
Glucose (3 mg/ml)	c) 1,92 ± 0,38 (n=21)	h) 2,57 ± 0,26 (n=4)	0,75	
Glucose (1 mg/ml) + Leucin (10 mM)	d) 0,97 ± 0,14 (n=30)	i) 1,30 ± 0,12 (n=13)	0,75	
Glucose (2 mg/ml) + Arginin (10 mM)	e) 0,92 ± 0,13 (n=33)	k) 1,81 ± 0,30 (n=15)	0,51	

Tabelle IX : Einfluß von Glucose, Leucin und Arginin auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln der Ratte an 6-Phosphogluconat und Glucose-6-phosphat sowie deren 6-PG/G-6-P-Quotienten.
Je 10 (5) Inseln wurden in 2 (1) ml Medium 30 min lang inkubiert.
Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche

7. Literaturverzeichnis

(1) Fajans, S.S., Floyd, Jr., J.C., Knopf, R.F., Pek, S., Weissman, P. and Conn, J.W.:
Amino acids and insulin release in vivo.
Israel J. Med. Sci. 8, 233 - 243 (1972)

(2) Floyd, Jr., J.C., Fajans, S.S., Conn, J.W., Knopf, R.F. and Rull, J.:
Stimulation of insulin secretion by amino acids.
J. Clin. Invest. 45, 1487 (1966)

(3) Malaisse, W., Malaisse-Lagae, F.:
Stimulation of insulin secretion by noncarbohydrate metabolites.
J. Lab. and Clin. Med. 72, 438 - 448 (1968)

(4) Sussman, K., Vaughan, G. and Stjernholm, M.:
Factors controlling insulin secretion in the perfused isolated rat pancreas.
Diabetes, Proc. 6th Congr. int. Diabetes Fcd.
Stockholm, I.C.S. No 172, 123 - 137 (1967)

(5) Basabe, J.C., Lopez, N.L., Viktora, J.K. and Wolff, F.W.:
Insulin secretion studied in the perfused rat pancreas.
Diabetes 20, 449 - 456 (1971)

(6) Lambert, A.E., Jenrenaud, B., Junod, A. and Renold, A.E.:
Insulin release induced by amino acids.
Biochem. Biophys. Acta 174, 540 -553 (1969)

(7) Milner, R.D.G.:
The mechanism by which leucine and arginine stimulate insulin secretion.
Biochem. Biophys. Acta 192, 154 - 156 (1969)

(8) Levin, S.R., Grodsky, G.M., Hagura, R., Smith, D.F. and Forsham, P.H.:
Relationships between arginine and glucose in the induction of insulin secretion from the isolated perfused rat pancreas.
Endocrinology 90, 624 - 631 (1972)

(9) Panten, U., Christians, J., Kriegstein, E.v., Poser, W. and Hasselblatt, A.:
Studies of the mechanism of L-leucine- and -KIC-induced insulin release from perifused isolated pancreatic islets.
Diabetologia 10, 149 - 154 (1974)

(10) Ashcroft, S.J.H., Hedeskov, C.J. and Randle, P.J.:
Glucose metabolism in mouse pancreatic islets.
Biochem. J. 118, 143 - 154 (1970)

(11) Grodsky, G.M., Batts, A.A., Bennet, L.L., Vcella, C., Mc Williams, N.B. and Smith, D.F.:
Effects of carbohydrates on secretion of insulin from isolated rat pancreas.

(12) Hellman, B.:
Methodological approaches to studies on the pancreatic islets.
Diabetologia 6, 110 - 120 (1970)

(13) Ashcroft, S.J.H., Basset, J.M. and Randle, P.J.:
Insulin secretion mechanism and glucose metabolism in isolated rat islets.
Diabetes 21, 538 - 545 (1971)

(14) Ashcroft, S.J.H., Weerasinghe, L.C.C. and Randle, P.J.:
Interrelationship of islets metabolism, adenosin triphosphate content and insulin release.
Biochem. J. 132, 223 - 231 (1973)

(15) Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, A., Sehlin, J. and Täljedahl, I.-B.:
The pancreatic ß-cell recognition of insulin secretagogues. Effect of calcium and sodium on glucose metabolism and insulin release.
Biochem. J. 138, 33 - 45 (1974)

(16) Ashcroft, S.J.H., Weerasinghe, L.C.C., Basset, J.M. and Randle, P.J.:
The pentose phosphate cyclus and insulin release in mouse pancreatic islets.
Biochem. J. 126, 525 - 532 (1972)

(17) Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, A., Sehlin, J. and Täljedahl, I.-B.:
The pancreatic ß-cell recognition of insulin secretagogues. VIII. Comparison of glucose with glyceraldehyde isomers and dihydroxyacetone.
Arch. Biochem. Biophys. 162, 448 - 457 (1974)

(18) Andersson, A., Höiriis-Nielsen, J. and Borg, L.A.H.:
Effects of L-leucine on the insulin production, oxydative metabolism and mitochondrial ultrastructure of isolated mouse pancreatic islets in tissue culture.
Diabetologia 13, 59 - 69 (1977)

(19) Lazarow, A., Dixit, P.K., Lindall, A., Moran, J., Hostetler, K. and Cooperstein, S.J.:
Enzyme specialization in islet tissue.
in The Structure and Metabolism of the pancreatic islet.

(Brolin, S.E., Hellman, B. and Knutson, H. eds.)
Pergamon Press, Oxford, 249 - 268 (1964)

(20) Brolin, S.E., Berne, C. and Linde, B.:
Measurement of the enzymatic activities required for ATP-formation by glycolysis in the pancreatic islets.
Diabetes 16, 21 (1967)

(21) Coll-Garcia, E., Gill, J.R.:
Insulin release by isolated pancreatic islets of the mouse incubated in vitro.
Diabetologia 5, 61 (1969)

(22) Howell, S.L., Young, D.A. and Lacy, P.E.:
Isolation and properties of secretory granules from rat islets of Langerhans.
J. Cell Biolog. 41, 167 (1969)

(23) Kilo, C., Devrim, S., Bailey, R. and Recant, L.:
Studies in vivo and in vitro of glucose-stimulated release of insulin. The effects of metabolizable sugars tolbutamide and 2-desoxyglucose.
Diabetes 16, 377 (1967)

(24) Webb, J.L.:
Enzyme and metabolic inhibitors.
Academic Press, New York (1966)

(25) Georg, R.H., Sussman, K.E. and Kirsch, W.L.:
Modification of glucose- and tobutamide-induced insulin release by jodoacetate and Antimycin A.
Fed. Proc. Intersoc. 316 - 321, 249 Abs. (1971)

(26) Renold, A.E.:
Insulin biosynthesis and secretion. A still unsettled topic.
New Engl. J. Med. 282, 173 (1970)

(27) Kanazawa, Y., Orci, L. and Lambert, A.E.:
Organ culture of fetal rat pancreas.
IV. Effects of metabolic inhibitors on insulin release.
Endocrinology 89, 576 - 583 (1971)

(28) Ammon, H.P.T., Verspohl, E. and Händel, M.:
Pentose phosphate shunt activity of pancreatic islets depends on glucose concentration.
Diabetologia 13, 377 Abstract (1977)

(29) Heinze, E. and Steinke, J.:
Glucose metabolism of isolated pancreatic islets:
Difference between fetal , newborn and adult rats.
Endocrinology 88, 1259 - 1263 (1971)

(30) Ammon, H.P.T. and Verspohl, E.:
Pyridine nucleotides in pancreatic islets during inhibition of insulin release by exogenous insulin.
Endocrinology 99 1469 - 1476 (1976)

(31) Ammon, H.P.T. and Steinke, J.:
6-Aminonicotinamide as a diabetogenic agent.
In vitro and in vivo studies in rats.
Diabetes 21, 143 - 148 (1972)

(32) Ammon, H.P.T. and Steinke, J.:
Effect of 6-Aminonicotinamide on insulin release and ^{14}C-glucose oxidation by isolated pancreatic rat islets: Difference between glucose, tolbutamide and theophylline.
Endocrinology 91, 33 - 38 (1972)

(33) Ammon, H.P.T., Verspohl, E. and Wagner-Teschner, D.:
Possible significance of NADPH in glucose-induced insulin release. (Manuskript in Vorbereitung)

(34) Ammon, H.P.T. and Wagner-Teschner, D.:
Effect of starvation on glucose-induced insulin release and NADPH/NADP-ratio in rat pancreatic islets.
(wird veröffentlicht)

(35) Ammon, H.P.T.:
Effect of glucose and methylene blue on NADP, NADPH and insulin secretion of isolated pancreatic rat islets.
Arch. Pharmacolog. 272 Suppl. R1 (Abstract) (1973)

(36) Lowry, O.H., Passonneau, J.W., Schulz, D.W. and Rock:
The measurements of pyridine nucleotides by enzymatic cycling.
J. Biol. Chem. 236, 2746 - 2755 (1961)

(37) Umbreit, W.W., Burris, R.H. and Stauffer, J.P.:
Manometric and biochemical techniques.
5th Edition, Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minnesota, USA, p 146 (1972)

(38) Passonneau, J.V. and Lowry, O.H.:
Messung durch enzymatic cycling.
in Methoden der enzymatischen Analyse, Bergmeyer ed.
3. Aufl. 1974 II 2108 - 2122 (Verlag Chemie, Weinheim)

(39) Lang, G. and Michal, G.:
D-Glucose-6-phosphat und D-Fructose-6-phosphat.
in Methoden der enzymatischen Analyse, Bergmeyer ed.
3. Aufl. 1974 II 1283 - 1287 (Verlag Chemie, Weinheim)

(40) Haid, E.:
D-Gluconat-6-phosphat.
in Methoden der enzymatischen Analyse, Bergmeyer ed.
3. Aufl. 1974 II 1293 - 1295 (Verlag Chemie, Weinheim)

(41) Lacy, P.E. and Kostianovsky, M.:
Method for isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas.
Diabetes 16, 35 - 39 (1967)

(42) Soeldner, J.S. and Slone, D.:
Critical variables in the radioimmunoassay of serum insulin using the double antibody technique.
Diabetes 14, 771 - 779 (1965)

(43) Lowry, O.H., Passonneau, J.V., Hasselberger, F.X. and Schulz, D.W.:
Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain.
J. Biol. Chem. 239, 18 - 30 (1964)

(44) Akhtar, M.S., Verspohl, E., Hegner, D. and Ammon,H.P.T.:
6-Phosphogluconate/glucose-6-phosphate ratio in rat pancreatic islets during inhibition of insulin release by exogenous insulin.
Diabetes 26, No 9, 857 - 863 (1977)

(45) Mac Donald, M.J., Ammon, H.P.T., Patel, T. and Steinke,J.:
Failure of 6-Aminonicotinamide to inhibit the potentiating effect of leucine and arginine on glucose-induced insulin release in vitro.
Diabetologia 10, 761 - 765 (1974)

(46) Hellman, B., Sehlin, J. and Täljedahl, I.-B.:
Effects of glucose and other modifiers of insulin release on the oxidative metabolism of amino acids in micro-dissected islets.
Biochem. J. 123, 513 - 521 (1971)

(47) Panten, U., Kriegstein, E.v., Poser, W., Schönborn, J. and Hasselblatt, A.:

Effects of L-leucine and α-ketoisocaproic acid upon insulin secretion and metabolism of isolated pancreatic islets.
FEBS Letters 20, 225 - 228 (1972)

(48) Goberna, R., Tamarit, Jr., J., Osorio, J., Fussgänger, J., Tamarit, J. and Pfeiffer, E.F.:
Action of ß-hydroxybutyrate, acetoacetate and palmitate on the insulin release in the perfused isolated rat pancreas.
Horm. Metab. Res. 6, 256 - 260 (1974)

(49) Gylfe, E. and Sehlin, J.:
Interaction between the metabolism of L-leucine and D-glucose in the pancreatic ß-cells.
Horm. Metab. Res. 8, 7 - 11 (1976)

(50) Ammon, H.P.T., Patel, T.N. and Steinke, J.:
The role of pentose phophate shunt in glucose-induced insulinrelease: In vitro studies with 6-aminonicotinamide, methylene blue, NAD, NADH, NADP, NADPH and nicotinamide on isolated pancreatic islets.
Biochim. Biophys. Acta 297,352 - 367 (1973)

(51) Ammon, H.P.T., Akhtar, M.S., Niklas, H. and Hegner, D.:
Inhibition of p-chloromercuribenzoate- and glucose-induced insulin release in vitro by methylene blue, diamide and tert-butylhydroperoxide.
Mol. Pharmacol. 13, 598 - 605 (1977)

(52) Watkins, D., Cooperstein, S.J. and Lazarow, A.:
Stimulation of insulin release by pyridine nucleotides.
Endocrinology 88, 1380 - 1384 (1971)

(53) Hellman, B.:
Islet morphology and glucose metabolism in relation to the specific function of the pancreatic ß-cells. in Östman, J., Milner, R.G. (Eds): Diabetes. Experta Medica Foundation, Amsterdam, p 92 (1969)

(54) Gylfe, E.:
Comparison of the effect of leucines, non-metabolizable leucine analogues and other insulin secretagogues on the activity of glutamate dehydrogenase.
Acta diabet. lat. 13, 20 - 24 (1976)

(55) Frerichs, H., Reich, U. and Creutzfeld, W.:
Insulin secretion in vitro.
Klin. Wschr. 43, 136 - 141 (1965)

(56) Iversen, J. and Miles, D.W.:
Evidence for a feedback inhibition of insulin on insulin secretion in the isolated perfused canine pancreas.
Diabetes 20, 1 - 9 (1971)

(57) Rappaport, A.M., Ohira, S., Coddling, J.A., Empey, G., Kalnius, A., Lin, B.J. and Haist, R.E.:
Effects on insulin output and on pancreatic blood flow of exogenous insulin infusion into an in situ isolated portion of the pancreas.
Endocrinology 91, 168 - 176 (1972)

(58) Montague, W. and Taylor, K.W.:
Islet-cell metabolism during insulin release: Effects of glucose, octanoate, tolbutamide, glucagon and theophylline.
Biochem. J. 115, 257 - 262 (1969)

(59) Katz, J. and Wood, H.G.:
The use of ^{14}C-Glucose for the evaluation of the pathways of glucose metabolism.
The J. of Biolog. Chemistry 235 2165 - 2177 (1960)

(60) Bloom, G.D., Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark,A., Sehlin, J. and Täljedahl, I.-B.:
Effects of organic mercurials on mammalian pancreatic ß-cells. Insulin release, glucose transport, glucose oxidation, membrane permeability and ultra structure.
Biochem. J. 129 241 - 254 (1972)

(61) Rink, H.:
Thiol compounds in radiation biology.
in Glutathione-Proceedings of the 16th Conference of the german Society of Biological Chemistry (Flohé, L., Benöhr, H.Ch., Siess, H., Weller, H.D. and Wendel, A. eds). Georg Thieme Publishers, Stg. p 206 - 216 (1975)

(62) Pillion, D.J. and Leibach, F. H.:
The effect of diamide and glutathione on the uptake of a-metyl-D-glucoside by slices of rat kidney cortex.
Biochim. Biophys. Acta 382, 246 - 252 (1975)

(63) Rall, T.W. and Lehninger, A.L.:
Glutathione reductase of animal tissues.
J. Biolog. Chem. 194, 119 - 130 (1952)

(64) Kosower, N.S., Kosower, E.M., Wertheim, B. and Correa, W.S.:
Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 593-596 (1969)

(65) Kosower, E.M., Correa, W., Kinon,B.J. and Kosower, N.S.:
Glutathione VIII. Difference among substrates by the thiol oxidizing agent, diamide.
Biochim. Biophys. Acta 264, 39 - 44 (1972)

(66) Srivastava, S.K., Awasthi, Y.C. and Deutler, E.:
Useful agents for the study of glutathione metabolism in erythrocytes- Organic hydro-peroxides.
Biochem. J. 139, 289 - 295 (1974)

(67) Sies, C., Gertenecker. C., Menzel, H. and Flohe', L.:
Oxidation in the NADP system and release of GSSG from hemoglobin free perfused rat liver during peroxidatic oxidation of glutathione by hydroperoxides.
FEBS Lett. 27, 171 - 175 (1972)

(68) Ammon, H.P.T., Wagner-Teschner, D., Grimm, A. and Niklas,H.:
Relationship between NADPH, glutathione and glucose-induced insulin secretion in pancreatic rat islets.
Venezia joint meeting of german and italian pharmacologists, Abstract p 314 (1977)

(69) Grimm, A.:
Einfluß von t-Butylhydroperoxid auf den insulären Glutathiongehalt. (unveröffentlichte Daten)

(70) Pagliara, A.S., Hover, B.A., Ellermann, J. and Matschinsky, F.M.:
Jodoacetate and jodoacetamide-induced alterations of pancreatic- and ß-cell responses.
Endocrinolgy 97, 698 - 708 (1975)

(71) Christensen, H.N. and Cullen, A.M.:
Behaviour in the rat of a transport specific bicyclic amino acid.
J. Biol. Chem. 244, 1521 - 1526 (1969)

(72) Cerasi, E. and Luft, R.:
Diabetes mellitus- a disorder of cellular information transmission.
Horm. metab. Res. 2, 246 - 249 (1970)

(73) Matschinsky, F.M., Landgraf, R., Ellermann, J. and Kotler-Brajtburg, E.:
Glucoreceptor mechanism in islets of Langerhans.
Diabetes 21, 555 - 569 (1972)

(74) Hellman, B., Sehlin, J. and Täljedahl, I.-B.:
The pancreatic ß-cell recognition of insulin secretagogues. II Site of action of tolbutamide.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 1384 - 1388 (1971)

(75) Hellman, B., Idahl, L.-A., Lernmark, A. Sëhlin, J. and Täljedahl, I.-B.:
Membrane sulfhydryl groups and the pancreatic ß-cell recognition of insulin secretagogues.
in Diabetes (Malaisse, W.J. and Pirart, J. eds.)
Excepta Media Foundation, Amsterdam, p 65 -78 (1974)

(76) Matthews, E.K. and Dean, P.M.:
Electrical activity in islet cells.
in The Structure and Metabolism of the Pancreatic Islets (Falkmer, S., Hellman, B. and Täljedahl, I.-B. eds.) Pergamon Press, Oxford 2, 305 - 313 (1970)

(77) Efendic, S., Cerasi, E. and Luft, R.:
Arginine-induced insulin release in relation to the cyclic AMP-system in man.
Clin. Endocrinolog. and Metab. 34, 67 - 72 (1972)

(78) Panten, U. and Christians, J.:
Effects of 2-endo-amino bornane-2-carboxylic acid upon insulin secretion and fluorescence of reduced pyridine nucleotides of isolated perifused pancreatic islets.
NaunynSchmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 276, 55 - 62 (1973)

(79) Akhtar, M.S., Hoppe, E., Niklas, H. and Ammon, H.P.T.:
Effect of leucine and arginine on islet pyridine nucleotide contents and insulin release: in vitro interactions with methylene blue, thiol oxidants and p-chloromercuribenzoate. (in preparation)

(80) Ohneda, A., Parada, E., Eisentraut, A.M. and Unger, R.H.:
Characterisation of response of circulating glucagon to intraduodenal and intravenous administration of amino acids.
J. Clin. Invest. 47, 2305 - 2322 (1968)

(81) Malaisse, W.J., Malaisse-Lague, F. and Mayew, D.:
A possible role for the adenyl cyclase system in insulin secretion. J. Clin. Invest. 46 1724-34 (1967)

Lebenslauf

Am 20. Juli 1951 wurde ich, Erika Hoppe, als Tochter des Revierjägers Helmut Hoppe und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Mundt, in Buxtehude (Krs. Stade) geboren.

Im Oktober 1952 zogen meine Eltern nach Heidenau (Krs. Harburg), wo ich im Frühjahr 1957 in die Volksschule eintrat. Von März 1961 bis März 1963 besuchte ich die Mittelschule Tostedt und wechselte dann zum St. Viti-Gymnasium Zeven (Krs. Bremervörde) über, das ich im Juni 1969 nach bestandenem Abitur verließ.

Das pharmazeutische Praktikum begann ich im August 1969 in der Billstedter Apotheke in Hamburg und konnte es im September 1971 mit der pharmazeutischen Vorprüfung abschließen.

Ab Oktober 1971 studierte ich im Fach Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, legte dort im Oktober 1973 den ersten Teil und im März 1975 den zweiten Teil der Pharmazeutischen Prüfung ab.

Im April 1975 begann ich bei Herrn Prof. Dr. H. P. T. Ammon mit der vorliegenden Dissertation, die ich im April 1978 abschloß.

Von Mai bis Oktober 1975 war ich als wissenschaftliche Hilfskraft am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen angestellt. Vom November 1975 bis zum Oktober 1976 wurde mir ein Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz gewährt. Anschließend war ich wieder als wissenschaftliche Hilfskraft am Pharmazeutischen Institut tätig.

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Professor Dr. H.P.T. Ammon waren die Herren Professoren H. Auterhoff, E. Graf, H. Hamacher, K.-A. Kovar, F. Moll, E. Reinhard (Pharmazie); R.E. Bader (Bakteriologie u. Hygiene); E. Müller, W. Rüdorff (Chemie); H. Seiler (Physik); M. Siess (Pharmakologie).